

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL

TERAPIAS BIOLÓGICAS EN LA ENFERMEDAD

INMUNOMEDIADA DEL OÍDO INTERNO.

ESTUDIO CLÍNICO-EXPERIMENTAL CON ETANERCEPT

DAVID ROBINSON LOBO DURO

MADRID, 2013

**TERAPIAS BIOLÓGICAS EN LA ENFERMEDAD INMUNOMEDIADA
DEL OÍDO INTERNO.**

ESTUDIO CLÍNICO-EXPERIMENTAL CON ETANERCEPT

DAVID ROBINSON LOBO DURO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

DIRECTORES

DR. RAFAEL RAMÍREZ CAMACHO

Profesor Titular de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid. Acreditado para el Cuerpo de Catedráticos de Universidad por la ANECA en 2012.

Jefe de Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda.

DR. JOSÉ RAMÓN GARCÍA BERROCAL

Profesor Asociado de Ciencias de la Salud. Departamento de Cirugía. Acreditado para el Cuerpo de Profesores Titulares de Universidad por la ANECA en 2009.

Médico Adjunto del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda.

MADRID, 2013

D. RAFAEL RAMÍREZ CAMACHO, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid y

D. JOSÉ RAMÓN GARCÍA BERROCAL, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN:

Que D. DAVID ROBINSON LOBO DURO, natural de Roma, con D.N.I. 04847298W, Licenciado en Medicina y Especialista en Otorrinolaringología, ha trabajado bajo nuestra dirección en la elaboración de su Tesis Doctoral: “Terapias biológicas en la enfermedad inmunomediada del oído interno. Estudio clínico-experimental con etanercept”, considerando que se encuentra en las debidas condiciones para su defensa ante el Tribunal que proceda.

Madrid, a 12 de Marzo de 2013

Fdo: Dr R. Ramírez-Camacho

Fdo: Dr JR. García-Berrocal

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	3
▪ CONOCIMIENTOS ACTUALES EN EIOI	3
1.1. BREVE REPASO HISTÓRICO DE LA EIOI	3
1.2. DEFINICIÓN	3
1.3. SINÓNIMOS	4
1.4. IMPORTANCIA MÉDICA DE LA EIOI	4
1.5. RELEVANCIA SOCIOECONÓMICA DE LA EIOI	5
1.6. EPIDEMIOLOGÍA	5
1.7. ETIOLOGÍA	6
1.7.1. Factores etiológicos	6
1.7.2. Niveles de evidencia de una enfermedad autoinmunitaria	7
1.7.3. Evidencias de autoinmunidad en la EIOI	8
1.8. FISIOPATOLOGÍA	10
1.8.1. Modelos experimentales de laberintitis inmunoinducida	11
1.8.1.1. Modelo de laberintitis experimental mediante suero homólogo o heterólogo frente al tejido coclear	11
1.8.1.2. Modelo de laberintitis experimental por <i>keyhole limpet hemocyanin</i> (KLH)	11
1.8.1.3. Modelo de laberintitis experimental por transferencia de linfocitos T activados	12
1.8.1.4. Modelo de laberintitis experimental por autoanticuerpos	12
1.8.2. Secuencia inmunopatológica en la laberintitis experimental estéril	13
1.8.3. Inmunopatología	15
1.9. PRESENTACIÓN CLÍNICA	16
1.10. DIAGNÓSTICO DE LA EIOI	17
1.10.1. Diagnóstico clínico	17
1.10.2. Pruebas inmunológicas	17
1.10.3. Western blot	18
1.10.4. Estudios de imagen	19
1.10.5. Perfiles diagnósticos	21
1.10.6. EIOI en las enfermedades autoinmunes sistémicas	22
1.11. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	22
1.12. RETOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA EIOI	23
1.13. TRATAMIENTO DE LA EIOI	24
1.13.1. Corticoides	24
1.13.2. Metotrexato	28
1.13.3. Ciclofosfamida	29
1.13.4. Otros citotóxicos	30
1.13.5. Plasmaféresis	30

•NOVEDADES EN EL TRATAMIENTO DE LA EIOI	30
1.14. TRATAMIENTO INTRATIMPÁNICO	31
1.14.1. Farmacocinética de los glucocorticoides en el oído interno	32
1.14.2. Estudios clínicos	33
1.15. TERAPIAS BIOLÓGICAS	34
1.15.1. Definición de terapia biológica	34
1.15.2. Clasificación de las terapias biológicas	34
1.15.3. Inhibidores del TNF- α	35
1.15.3.1. Etanercept	36
1.15.3.2. Adalimumab	38
1.15.3.3. Infliximab	38
1.15.4. Antagonistas de la IL-1	39
1.15.4.1. Anakinra	39
1.15.5. Antagonistas del receptor CD20 de los linfocitos B	39
1.15.5.1. Rituximab	39
II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
2.1. HIPÓTESIS	45
2.2. OBJETIVOS	45
III MATERIAL Y MÉTODOS	49
A) ESTUDIO EXPERIMENTAL	49
3.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	49
3.2. INSTRUMENTAL	50
3.2.1. Instrumental quirúrgico	50
3.2.2. Equipo de anestesia	50
3.2.3. Equipo de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC)	51
3.2.4. Microscopio quirúrgico	51
3.2.5. Microscopio óptico	51
3.2.6. Microscopio electrónico de barrido (MEB)	51
3.3. ANESTESIA	51
3.3.1. Anestesia intraoperatoria	51
3.3.2. Sedación para la realización de PEATC	52
3.3.3. Anestesia presacrificio	52
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL	52
3.4.1. Protocolo de inmunización	52
3.4.2. Grupos	53
3.5. INMUNIZACIÓN DEL COBAYA	55
3.5.1. Inmunización primaria	55

3.5.1.1. <i>Keyhole limpet hemocyanin</i> (KLH)	55
3.5.1.2. Adyuvantes de Freund	55
3.5.1.3. Lugar de punción	56
3.5.2. Inmunización secundaria. Técnica quirúrgica	57
3.5.2.1. Anestesia	57
3.5.2.2. Preparación quirúrgica	57
3.5.2.3. Anatomía quirúrgica	58
3.5.2.4. Abordaje quirúrgico del oído medio del cobaya	59
3.5.2.5. Inmunización intracoclear	61
3.5.2.6. Cuidado postoperatorio	62
3.6. EXPLORACIÓN DE LA AUDICIÓN	62
3.6.1. Reflejo de Preyer	62
3.6.2. Otoscopia	62
3.6.3. Estudio electrofisiológico	63
3.6.3.1. Sedación del cobaya	63
3.6.3.2. Protocolo de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC)	63
3.7. EXPLORACIÓN VESTIBULAR	65
3.8. PROCESAMIENTO HISTOPATOLÓGICO	65
3.8.1. Sacrificio. Fijación intravital	65
3.8.2. Obtención y procesamiento de las muestras	68
3.8.2.1. Procesamiento de las cócleas para microscopia óptica	69
3.8.2.2. Procesamiento de las cócleas para microscopia electrónica de barrido (MEB)	70
3.9. ESTUDIO DEL OÍDO INTERNO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA	71
3.10. ESTUDIO DEL OÍDO INTERNO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)	71
3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	73
B) REVISIÓN DE ENSAYOS CLÍNICOS	74
IV RESULTADOS	77
A) ESTUDIO EXPERIMENTAL	77
4.1. EXPLORACIÓN OTOVESTIBULAR	77
4.1.1. Otoscopia	77
4.1.2. Alteraciones vestibulares	78
4.2. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO	78
4.3. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	83
4.3.1. Resultados macroscópicos	83
4.3.2. Resultados microscópicos	85
4.3.2.1. Resultados obtenidos en el grupo piloto	85
4.3.2.2. Resultados con microscopia electrónica de barrido (MEB)	85

B) REVISIÓN DE ENSAYOS CLÍNICOS CON INHIBIDORES DEL TNF-ALFA	94
B1. ETANERCEPT	94
B2. INFLIXIMAB	96
B3. ADALIMUMAB	97
V DISCUSIÓN	105
A) ESTUDIO EXPERIMENTAL	105
5.1. ELECCIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	105
5.2. ELECCIÓN DEL MODELO DE LABERINTITIS EXPERIMENTAL AUTOINMUNE	106
5.2.1. Necesidad de utilizar un modelo animal de laberintitis experimental autoinmune	106
5.2.2. Elección del modelo de laberintitis por <i>keyhole limpet hemocyanin</i> (KLH)	106
5.3. ELECCIÓN DEL ABORDAJE QUIRÚRGICO	107
5.4. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO	109
5.4.1. Sedación del cobaya	109
5.4.2. Exploración funcional de la audición en el cobaya	109
5.4.3. Resultados de los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC)	110
5.4.3.1. Grupo control KLH	110
5.4.3.2. Grupo 6-metilprednisolona y grupo etanercept	110
5.4.3.3. Grupo control PBS	111
5.5. GRUPO PILOTO	113
5.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)	113
5.6.1. Métodos de cuantificación de la pérdida de células ciliadas	113
5.6.2. Resultados de MEB en el grupo control PBS	114
5.6.3. Resultados de MEB en cobayas inmunizados con KLH	116
5.6.4. Resultados de MEB en cobayas inmunizados con KLH y tratados con glucocorticoides	117
5.6.5. Resultados de MEB en cobayas inmunizados con KLH y tratados con etanercept	122
5.7. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ANIMALES TRATADOS CON ETANERCEPT, CON EL GRUPO DE ANIMALES TRATADOS CON GLUCOCORTICOIDES	125
B) REVISIÓN DE ENSAYOS CLÍNICOS	127
C) POSIBILIDADES FUTURAS EN EL TRATAMIENTO DE LA EIOI	131
VI CONCLUSIONES	137
VII REFERENCIAS	141

VIII ANEXOS	169
ANEXO I	171
ANEXO II	179
ANEXO III	189
ANEXO IV	201
ANEXO V	209
ANEXO VI	219
ÍNDICE ANTROPONÍMICO	225

LISTA DE TABLAS

LISTA DE TABLAS

	Pag
TABLA 1.1 Enfermedades autoinmunes	10
TABLA 1.2 Autoanticuerpos específicos e inespecíficos presentes en pacientes con EIOI y en modelos animales de laberintitis estéril	18
TABLA 1.3 Pruebas diagnósticas propuestas para la EIOI	20
TABLA 1.4 Perfil diagnóstico en la EIOI	21
TABLA 1.5 Costes de algunas pruebas diagnósticas en la EIOI	21
TABLA 1.6 Actividad antiinflamatoria e inmunorreguladora de los glucocorticoides. Mecanismo de acción de los pulsos intravenosos de metil-prednisolona	25
TABLA 1.7 Efectos secundarios de los glucocorticoides	27
TABLA 1.8 Agentes biológicos. Posología e indicaciones aprobadas por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA)	37
TABLA 3.1 Diseño experimental	55
TABLA 3.2 Preparación de la solución tamponada de paraformaldehído al 4%	67
TABLA 4.1 Otoscopia de los cobayas de los grupos 1 al 4 previa a la realización de los segundos PEATC	78
TABLA 4.2 Resultados de los PEATC pre y postinmunización (oído derecho)	79
TABLA 4.3 Resultados de los primeros PEATC en ambos oídos en los grupos 1 al 4	81
TABLA 4.4 Análisis de varianza (ANOVA) entre grupos	81
TABLA 4.5 Diferencia entre los PEATC pre y postinmunización en ambos oídos, grupos 1-4	82
TABLA 4.6 Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	83
TABLA 4.7 Resultados macroscópicos	84

TABLA 4.8 Resultados microscópicos. Porcentaje de pérdida de células ciliadas	85
TABLA 4.9 Resultados microscópicos. Comparación entre grupos	87
TABLA 4.10 Porcentaje de pérdida de células ciliadas externas por espira	88
TABLA 4.11 Número de cobayas dentro de cada grupo que presenta una pérdida igual o superior al 25% de células ciliadas externas e igual o superior al 20% de células ciliadas internas	88
TABLA 4.12 Alteraciones de los estereocilios y presencia de CCE duplicadas	93
TABLA 4.13 Tasas de respuesta a etanercept	96
TABLA 4.14 Otros inhibidores del TNF- α : infliximab y adalimumab	98
TABLA 4.15 Criterios de respuesta	98
TABLA 4.16 Parámetros temporales	100
TABLA 4.17 Otros síntomas otológicos	101
TABLA 5.1 Elección del modelo de laberintitis experimental autoinmune	107

LISTA DE ILUSTRACIONES

LISTA DE ILUSTRACIONES (FIGURAS)

	Pag
FIGURA 1.1 Etiología autoinmune sugerida en la EIOI	6
FIGURA 1.2 Transferencia pasiva de una laberintitis autoinmune mediada por linfocitos T	9
FIGURA 1.3 Células del infiltrado inflamatorio del lumen del saco endolinfático (hematoxilina-eosina; 100x)	13
FIGURA 1.4 Corte de la pared lateral de la cóclea del cobaya en la que se muestra la localización de los diferentes tipos de fibrocitos	14
FIGURA 1.5 Secuencia inmunopatológica en la laberintitis experimental por KLH	15
FIGURA 1.6 Respuesta inmunológica. Participación del TNF en los procesos inflamatorios y autoinmunes	35
FIGURA 1.7 Mecanismo de acción de los agentes biológicos	41
FIGURA 3.1 Inmunización subcutánea	57
FIGURA 3.2 Preparación quirúrgica	58
FIGURA 3.3 Abordaje quirúrgico retroauricular	59
FIGURA 3.4 Fresado óseo por encima de la pared posterosuperior del conducto auditivo externo con una fresa otoquirúrgica	60
FIGURA 3.5 Perfusión de KLH a través de la ventana practicada en la espira basal de la cóclea	61
FIGURA 3.6 Sutura de la herida	61
FIGURA 3.7 Cuidados postoperatorios. Colocación de los cobayas en una manta próximos a una fuente de aire caliente	62
FIGURA 3.8 Estudio electrofisiológico	64
FIGURA 3.9 Fijación intravital	66

FIGURA 3.10 Elección de un área representativa de una espira coclear formada por 10 células de sostén consecutivas (1600x)	72
FIGURA 4.1 Umbrales auditivos pre y postinmunización	80
FIGURA 4.2 Resultados microscópicos. Porcentaje de pérdida de células ciliadas	86
FIGURA 4.3 Ausencia de CCE en los grupos 1, 2, 3 y 4	89
FIGURA 4.4 Ausencia de CCI en la 3ª espira coclear	90
FIGURA 4.5 Glóbulos (estructuras globulares) junto a las CCI	91
FIGURA 4.6 Glóbulos junto a las CCI de la 2ª espira coclear	91
FIGURA 4.7 Desorganización de los cilios de las CCE de las hileras media y externa de la 3ª espira coclear y de la espira basal	92
FIGURA 4.8 Fusión de estereocilios de las CCE de la 2ª espira coclear	93
FIGURA 5.1 Contribución de la apoptosis en los mecanismos autoinmunitarios. Iniciación de la respuesta autoinmune	115
FIGURA 5.2 Contribución de la apoptosis en los mecanismos autoinmunitarios. Propagación y amplificación de la respuesta autoinmune	116
FIGURA 5.3 Posibles rutas de señalización del TNF- α y activación de NFkB mediada por GC	121

ABREVIATURAS

TABLA DE ABREVIATURAS

AECA	Anticuerpos anticélulas endoteliales	CKLH	Grupo control KLH
Ac	Anticuerpo	CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
Ag	Antígeno	CU	Colitis ulcerosa
Akt	Gen de la proteína-cinasa B	DEP-1	Tirosina fosfatasa (abreviatura inglesa de <i>density-enhanced phosphatase</i>)
ANA	Anticuerpo antinuclear	E	Grupo etanercept
ANCA	Anticuerpo anticitoplasma de neutrófilo	EA	Espondilitis anquilopoyética
ANOVA	Análisis de la varianza (abreviatura inglesa de <i>analysis of variance</i>)	EC	Enfermedad de Crohn
ANXA-1	Anexina A1	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
AP-1	Proteína activadora 1	EIOI	Enfermedad inmunomediada del oído interno
APs	Artritis psoriásica	ELISPOT	Análisis de inmunoadsorción enzimática
AR	Artritis reumatoide	Fab	Fragmento de unión al antígeno (del anticuerpo). (Abreviatura inglesa de <i>antigen-binding fragment</i>)
ARJP	Artritis reumatoide juvenil poliarticular	Fc	Fragmento cristizable (del anticuerpo)
C	Grupo control	GC	Glucocorticoide
C3	Factor 3 del sistema del complemento	GR	Receptor de glucocorticoides
CC	Células ciliadas.	HLA	Antígeno leucocitario humano.
CCE	Células ciliadas externas	HNS	Hipoacusia neurosensorial
CCI	Células ciliadas internas	HSP-70	Proteína de choque térmico 70 (Hsp abreviatura inglesa de <i>heat shock protein</i>)
CFA	Adyuvante completo de Freund	ICAM	Molécula de adhesión intercelular (MAIC)

IF	Inmunofluorescencia	NK	Linfocito NK (NK corresponden a las iniciales del inglés <i>natural killer</i>)
IFA	Adyuvante incompleto de Freund	PBS	Solución amortiguadora con fosfato (abreviatura inglesa de <i>phosphate buffered saline</i>)
Ig	Inmunoglobulina	PEATC	Potenciales evocados auditivos de tronco cerebral
IκB	Proteína inhibidora de NFκB	PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
IKK	IκB cinasa	PIP3	Fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato
IL-1	Interleucina 1	PMN	Leucocitos polimorfonucleares
IL-1 RA	Antagonista del receptor de interleucina 1	Ps	Psoriasis
INF-γ	Interferón gamma	RCT	Receptor de linfocitos T
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible	RM	Resonancia magnética
KHRI-3	Abreviatura inglesa de <i>Kresge Hearing Research Institute-3</i>	Stat 5	Transductor de señales y activador transcripcional 5
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>	TBC	Tuberculosis
LES	Lupus eritematoso sistémico	TEP	Tomografía por emisión de positrones
LLC	Leucemia linfática crónica	TGF β	Factor transformante del crecimiento β, factor de crecimiento transformante (FCT)
LNH	Linfoma no hodgkiniano	Th	Linfocito T cooperador (Th abreviatura inglesa de <i>T helper</i>)
LTC-2	Linfocito T citotóxico 2 (linfocito T _c 2)	TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa (FNT)
MEB	Microscopia electrónica de barrido	VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
MP	Grupo 6-metilprednisolona	VSG	Velocidad de sedimentación globular
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de los linfocitos B activados		

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se inició poco después de incorporarme al Grupo de Investigación Otológica del servicio de ORL del Hospital Puerta de Hierro y es el fruto de muchos años de esfuerzo. Sin embargo, no hubiera sido posible realizarlo sin la contribución y la generosidad de muchas personas.

En primer lugar, quiero agradecer a los doctores Rafael Ramírez Camacho y José Ramón García Berrocal, directores de esta tesis, su apoyo, su confianza y su amistad. Me han abierto las puertas al campo de la investigación facilitándome todos los medios necesarios para la realización de este estudio y me han orientado sabiamente durante todo el proceso. Son, en la palabra más noble del lenguaje, mis maestros.

También quiero dar las gracias al Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Puerta de Hierro, por permitir la utilización de sus instalaciones para la realización de la parte experimental de este trabajo, y de manera especial a Juan y Rocío, por su simpatía y su profesionalidad mientras me ayudaban en los procedimientos realizados en el quirófano. Siempre les recordaré con mucho cariño.

A Martín, a Francisco y a los cuidadores del animalario, por su amabilidad y por contribuir a la salud y el bienestar de los animales empleados en este estudio.

A Almudena, por enseñarme el manejo del cobaya y las técnicas de microscopia óptica.

A Carolina, por cederme generosamente su laboratorio y aconsejarme durante el proceso de fijación intravital.

A Esperanza y a Marta, por acogerme tan cordialmente en las magníficas instalaciones del laboratorio de microscopia electrónica de barrido del Servicio

Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid y contribuir en la obtención de las fotografías que acompañan este trabajo.

A Isabel, del Servicio de Bioestadística del Hospital Puerta de Hierro, por ayudarme amablemente con el análisis estadístico de esta tesis.

A Mónica y a Ian, por todo su ánimo y su apoyo durante la fase final de este trabajo.

A José María, a Andrés, a los compañeros del Hospital Puerta de Hierro, y a todos aquellos, que aunque no aparezcan aquí mencionados, han contribuido de una forma u otra a que este trabajo se haya hecho realidad.

A mis padres

y

a Mónica

I INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

▪ CONOCIMIENTOS ACTUALES EN EIOI

1.1. BREVE REPASO HISTÓRICO DE LA EIOI

El concepto de autoinmunidad como causa de un amplio espectro de enfermedades humanas no fue aceptado ampliamente por la comunidad científica hasta las décadas de 1950 y 1960. La autoinmunidad consiste en un fallo del organismo a la hora de reconocer sus propios constituyentes, por lo que se desencadena una reacción inmunitaria contra las propias células y tejidos (1).

En 1958 Lehnhardt fue el primero en proponer un mecanismo autoinmune para explicar algunos casos de sordera bilateral (2). Un año después, Kikuchi describió varios casos de otitis simpática en los que la audición en un oído se veía afectada por la cirugía en el oído contralateral (3). En 1979 Brian McCabe describió por primera vez la hipoacusia neurosensorial autoinmune como una nueva entidad clínica, presentando una serie de pacientes con hipoacusia neurosensorial que respondían a tratamiento inmunosupresor (4).

1.2. DEFINICIÓN

La enfermedad inmunomediada del oído interno (EIOI) se define como una hipoacusia neurosensorial bilateral, generalmente asimétrica, que progresa rápidamente en el curso de semanas o meses, y que responde a la administración de fármacos inmunosupresores (ciclofosfamida y corticosteroides) (4).

Si bien esta es la definición clásica de EIOI, la hipoacusia puede presentarse también de forma unilateral, brusca (lo que la haría indistinguible de una sordera súbita)

y tener un curso fluctuante, que en los casos que se acompaña de vértigo, sería indiferenciable de una enfermedad de Menière (5-7). Según McCabe, los síntomas vestibulares en la EIOI sí se podrían diferenciar de los que se presentan en la enfermedad de Menière. En concreto, observa un mayor número de crisis así como ataxia entre crisis en pacientes con EIOI (8).

1.3. SINÓNIMOS

La EIOI también se conoce como enfermedad autoinmune del oído interno o enfermedad cocleovestibular inmunomediada (9).

1.4. IMPORTANCIA MÉDICA DE LA EIOI

La importancia médica de la EIOI radica en el hecho de que representa una de las pocas causas de hipoacusia neurosensorial reversibles con tratamiento médico. Esto significa que mediante el uso de fármacos inmunomoduladores es posible interferir en su evolución deteniendo su progresión e incluso mejorando la función del oído interno.

El conocimiento de la EIOI ha abierto la posibilidad de emplear estos tratamientos en otras enfermedades del oído interno como son la enfermedad de Menière que en un 25-30% de los casos tiene un origen autoimmune (7, 10-13), o la sordera súbita, en las que se sospecha un origen inmunomediado en un subgrupo de pacientes, tras realizar un seguimiento clínico prolongado (14, 15).

Además, este hecho ha estimulado la búsqueda de tratamientos médicos para otras causas de hipoacusia neurosensorial como son la ocasionada por ototóxicos, el envejecimiento auditivo, o el trauma acústico, entidades que comparten un mecanismo de lesión final común, la apoptosis de las células del oído interno (16, 17).

1.5. RELEVANCIA SOCIOECONÓMICA DE LA EIOI

El hecho de que la EIOI sea potencialmente reversible con tratamiento médico implica un ahorro en recursos sanitarios, destinados a la adaptación de audífonos, implantes cocleares o de tronco cerebral, y sociolaborales, ya que se evita la pérdida de días de trabajo o puestos de trabajo por incapacidad, gracias a la recuperación precoz de un déficit sensorial tan importante para la comunicación humana y una normal interacción personal o laboral. Esto supone un ahorro económico, pues se estima que el coste social de la hipoacusia severa y profunda es de unos 250 000 euros por individuo a lo largo de su vida. En un estudio realizado en Estados Unidos se comprobó que la mayor parte de estos costes sociales se debían a la pérdida de productividad laboral (un 67% del total). Los costes de la educación especial en niños y jóvenes representaban un 21% y los costes médicos, como por ejemplo las prótesis auditivas, representaban un 11% del total de costes sociales relacionados con el déficit auditivo (18).

1.6. EPIDEMIOLOGÍA

No se conoce con exactitud la incidencia de la EIOI. Esto es debido a que no existe una prueba diagnóstica definitiva. Se considera que es menos frecuente que la sordera súbita cuya incidencia es de 1 caso por cada 5 000 a 10 000 habitantes al año (19-21). Se ha sugerido que es más frecuente en el sexo femenino y generalmente debuta entre los 20 y los 50 años de edad, siendo poco frecuente que aparezca en la infancia (22).

1.7. ETIOLOGÍA

1.7.1. Factores etiológicos

Una reacción autoinmune puede tener un efecto lesivo en la cóclea y puede iniciarse por un ataque autoinmune (23, 24), o cuando el sistema inmunitario trata de proteger el oído interno frente a una infección u otra agresión externa (25). Patógenos como los virus o las bacterias pueden alcanzar el oído interno desde el torrente sanguíneo (26), el líquido cefalorraquídeo o el oído medio (27). Otras lesiones causadas por cirugía, traumatismos o medicamentos pueden exponer proteínas del oído interno al sistema inmunitario induciendo una respuesta inmune frente a ambos oídos (28-31) (figura 1.1).

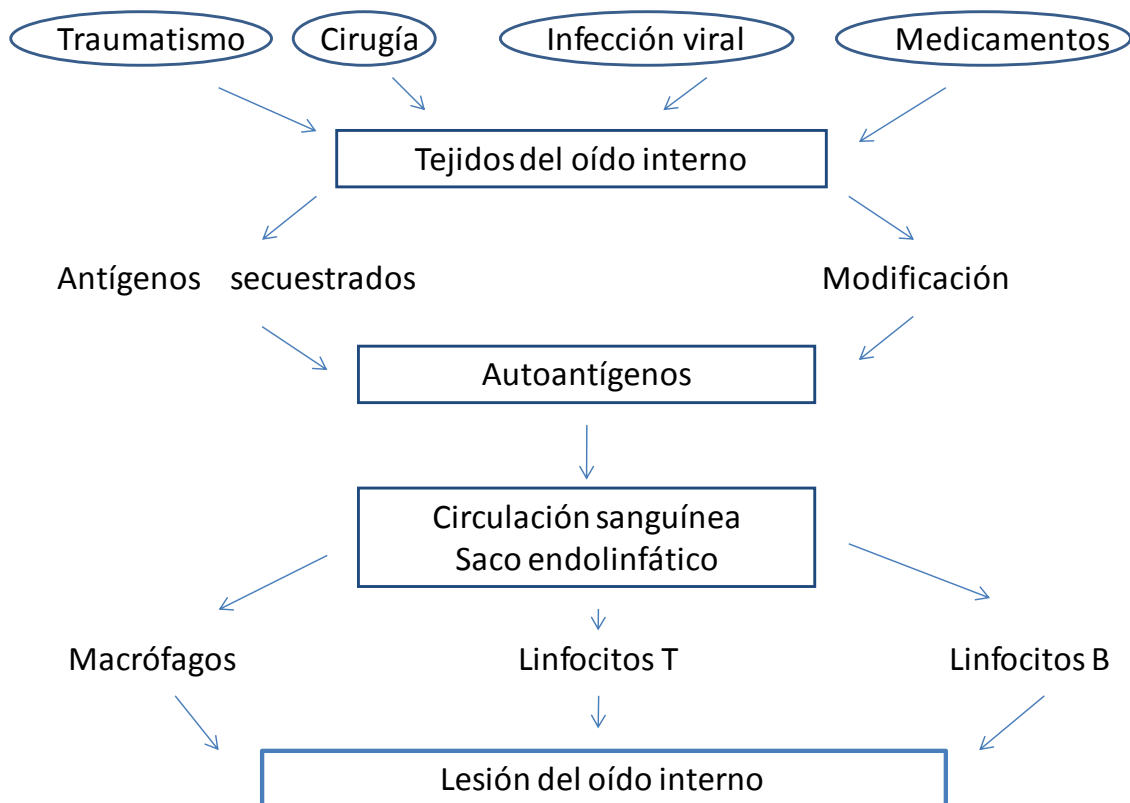


Figura 1.1 Etiología autoinmune sugerida en la EIOL. Modificada de García-Berrocal JR (32).

Estas agresiones externas sobre el oído interno pueden no sólo activar el sistema inmune sino dejar también lesiones tisulares permanentes que pueden desencadenar una respuesta autoinmunitaria más adelante.

1.7.2. Niveles de evidencia de una enfermedad autoinmunitaria

Independientemente de la causa subyacente, numerosos estudios han contribuido a esclarecer las bases inmunopatológicas de la EIOI, reuniendo distintos tipos de evidencia de la naturaleza autoinmune de esta enfermedad.

En general se pueden distinguir tres niveles de evidencia de una etiología autoinmune: directa, indirecta y circunstancial (33).

Evidencia directa: Requiere la transmisibilidad de las lesiones características de la enfermedad de humano a humano, o de humano a animal.

Evidencia indirecta: Consiste en la recreación de la enfermedad humana en un modelo animal. La mayoría de las enfermedades autoinmunes encajan en esta categoría.

Evidencia circunstancial: Cuando no se dispone de una evidencia directa o indirecta para definir una enfermedad como autoinmune, se utilizan distintos marcadores como son: historia familiar de enfermedad autoinmune, presencia en el mismo paciente de otras enfermedades autoinmunes conocidas (34), presencia de un infiltrado de células mononucleares en el órgano o tejidos afectados, predominancia de algunos alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II, niveles elevados de autoanticuerpos IgG, depósitos de complejos antígeno-anticuerpo en el órgano o tejido afectado o mejoría de la clínica con el uso de inmunosupresores (como los corticoides).

1.7.3. Evidencias de autoinmunidad en la EIOI

Como se expone a continuación, en la EIOI se han ido reuniendo distintos tipos de evidencia de su posible etiología autoinmune. Así, se han identificado numerosos autoanticuerpos algunos de los cuales al ser inyectados en otros animales han logrado reproducir la pérdida auditiva, hecho que parece indicar una patogenia mediada por autoanticuerpos IgG o inmunocomplejos (35). Las posibles dianas para estos autoanticuerpos serían la estría vascular, los fibrocitos del ligamento espiral y las células de soporte (36, 37).

También se ha logrado reproducir la pérdida auditiva transfiriendo células T de un animal a otro, lo que apoya la existencia así mismo de una respuesta inmunomediada celular (38-41) (figura 1.2).

Siguiendo una estrategia diferente, se han estudiado modelos animales de enfermedad autoinmune multisistémica, no órgano-específica como las cepas de ratón MRL-Faslpr y C3H-Faslpr, que constituyen un modelo de lupus eritematoso sistémico (LES), presentan una pérdida auditiva y muestran una degeneración de la estría vascular con depósito de anticuerpos (Ac) dentro de los capilares (42-44).

Finalmente hay numerosas evidencias circunstanciales de la naturaleza autoinmune de la EIOI. Se conoce la asociación de numerosas enfermedades autoinmunes con una disfunción del oído interno. El síndrome de Cogan es el prototipo de enfermedad autoinmune que conduce a una lesión en el oído interno. Se define como una queratitis intersticial no sifilítica, hipoacusia neurosensorial, vértigo y tinnitus (45, 46). En ocasiones se pueden presentar otras formas de inflamación ocular (uveítis, iritis, epiescleritis o conjuntivitis) en cuyo caso se denomina síndrome de Cogan atípico (47, 48). El síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada incluye además despigmentación de la piel

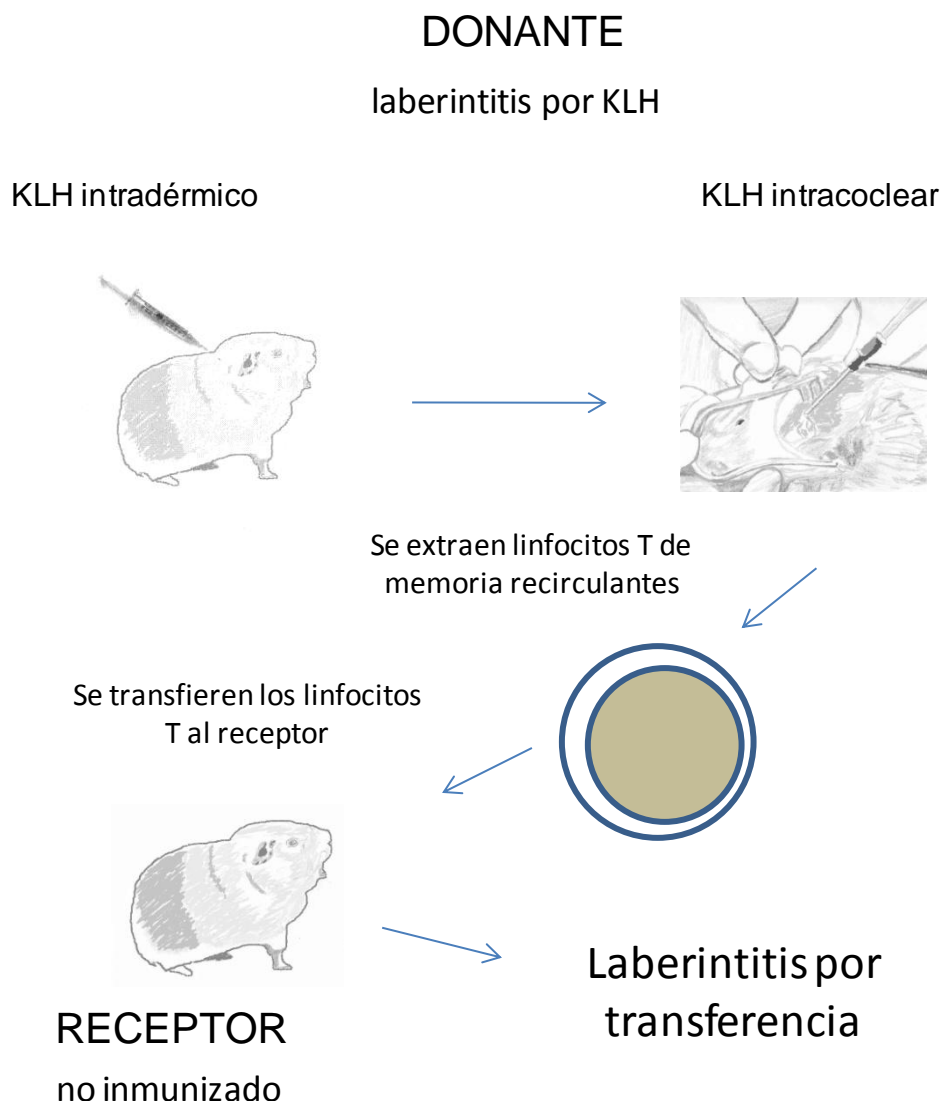


Figura 1.2 Transferencia pasiva de una laberintitis autoinmune mediada por linfocitos T (40, 41). KLH: *Keyhole limpet hemocyanin*.

alrededor de las pestañas, pérdida de las mismas y meningitis aséptica. El LES, la enfermedad de Behçet, el síndrome de Sjögren, la granulomatosis de Wegener o la tiroiditis de Hashimoto son algunas otras de las enfermedades autoinmunes sistémicas que pueden presentarse con disfunción audiovestibular (14, 49-51). En la tabla 1.1 se indican con un asterisco las enfermedades autoinmunes que se han asociado a hipoacusia neurosensorial de probable origen autoinmune.

Tabla 1.1 Enfermedades autoinmunes

Tabla 1.1	
Anemia hemolítica autoinmune *	Espondilitis anquilopoyética
Anemia perniciosa	Granulomatosis de Wegener *
Arteritis temporal *	Hepatitis autoinmune
Artritis reumatoide *	Lupus eritematoso *
Cirrosis biliar primaria	Miastenia gravis *
Colitis ulcerosa *	Penfigoide bulloso
Dermatomiositis *	Pénfigo vulgar
Diabetes mellitus tipo 1	Policondritis recidivante *
Encefalomielitis aguda diseminada *	Polimiositis *
Enfermedad celíaca *	Púrpura trombocitopénica idiopática *
Enfermedad de Addison	Síndrome de anticuerpos antifosfolípido (APS)
Enfermedad de Behçet *	Síndrome de Goodpasture *
Enfermedad de Graves *	Síndrome de Guillain-Barré
Enfermedad de Hashimoto *	Síndrome de Sjögren *
Esclerosis múltiple *	Vasculitis *

* Con un asterisco se indican aquellas que se asocian a la EIOI.

También se ha establecido una asociación entre determinados alelos del antígeno leucocitario humano (HLA) como son el DR4-, cw7+, cw4+ o B35, y la EIOI (7, 52-54).

Por último, la respuesta a los corticosteroides en pacientes con sospecha de EIOI es un valioso indicador de su posible etiología autoinmune, en numerosas ocasiones el único junto con la clínica.

1.8. FISIOPATOLOGÍA

Debido a que no es posible biopsiar el oído interno durante el curso de la enfermedad ya que esto supondría la pérdida de su función, y a que se disponen de muy pocos estudios de necropsias, mayoritariamente de pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas (55), se han desarrollado distintos modelos animales de laberintitis autoinmune para conocer la patogenia de la EIOI (37).

1.8.1. Modelos experimentales de laberintitis inmunoinducida

1.8.1.1. Modelo de laberintitis experimental mediante suero homólogo o heterólogo frente al tejido coclear

Es el primer modelo animal utilizado para estudiar la autoinmunidad en el oído interno, y fue empleado por primera vez en 1961 por Beickert, quien observó alteraciones histopatológicas en los cobayas inmunizados con tejido homólogo coclear (56). Posteriormente, Terayama y Sasaki observaron cambios histopatológicos en la cóclea de los cobayas inmunizados con adyuvante de Freund (hemorragia en la escala timpánica, desintegración del órgano de Corti) junto con una pérdida del reflejo de Preyer (movimiento involuntario de las orejas en respuesta a un sonido) aunque no intentaron correlacionar los hallazgos histopatológicos con un mecanismo de autorreactividad (57). En estudios subsiguientes realizados con este modelo se han obtenido resultados variables, desde ausencia de cambios histopatológicos en la cóclea a desarrollo de un hidrops endolinfático, edema, hemorragia e infiltrados inflamatorios perivasculares. Este modelo, al utilizar un homogenado de oído interno, no permite caracterizar los autoantígenos específicos involucrados en el desarrollo de la enfermedad (58-60).

1.8.1.2. Modelo de laberintitis experimental por *keyhole limpet hemocyanin* (KLH)

El desarrollo por Harris de una laberintitis estéril en rata y en cobaya mediante la inoculación de KLH ha permitido conocer que el oído interno no es un órgano inmunológicamente aislado (61, 62). El saco endolinfático contiene células del sistema inmune capaces de producir o reforzar una respuesta inmunitaria, y el epitelio del saco tiene capacidad para secretar inmunoglobulinas IgA que están presentes en la perilinfa

(63, 64). La vena espiral del modiollo es la puerta de entrada de elementos inmunológicos (células T, células B, células NK, leucocitos polimorfonucleares, macrófagos) (65, 66), que pueden desencadenar una laberintitis que conduce a una alteración funcional con pérdida de células sensoriales y finalmente a la fibrosis y osteoneogénesis coclear (67-69).

1.8.1.3. Modelo de laberintitis experimental por transferencia de linfocitos T activados

También se ha logrado reproducir la pérdida auditiva en rata, ratón y cobaya transfiriendo células T activadas de un animal a otro. Para lograr la activación de los linfocitos T frente a antígenos del oído interno se han utilizado tanto homogeneizados del mismo (40, 41) como péptidos específicos como la coclina (70), expresada abundantemente en el oído interno (71), o la β -tectorina (72).

1.8.1.4. Modelo de laberintitis experimental por autoanticuerpos

Inmunizando ratones con extractos de oído interno de pollo y de cobaya se han generado anticuerpos monoclonales frente a las células del oído interno. Uno en particular, el KHRI-3 (abreviatura inglesa de *Kresge Hearing Research Institute-3*) se une a las células de sostén del órgano de Corti y causa pérdida auditiva cuando se inyecta en cobayas (36). Se ha demostrado que este anticuerpo reconoce el mismo antígeno de oído interno que reconocen otros anticuerpos detectados en pacientes con EIOI (73). Este antígeno se localiza en la región de 68 a 72 kDa como la proteína de choque térmico 70 (HSP-70). Estudios recientes muestran que el KHRI-3 se une a múltiples péptidos presentes en la enormemente conservada proteína CTL2 (*choline transporter-like protein 2*) que se expresa tanto en humanos como en el cobaya, y que coprecipita con la coclina (74). La ausencia de infiltrados celulares en estos modelos

sugiere un mecanismo de lesión mediado por anticuerpos o inmunocomplejos, de la estría vascular, del ligamento espiral o de las células de sostén, las cuales regulan la homeostasis de las células ciliadas (CC) (37, 75).

1.8.2. Secuencia inmunopatológica en la laberintitis experimental estéril

Las células del lumen del saco endolinfático expresan el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que alcanza un primer pico tan sólo 3 horas después de la exposición al antígeno, iniciando y amplificando la respuesta inmune (76, 77) (figura 1.3). Al mismo tiempo las células del infiltrado inflamatorio expresan factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en la luz del saco endolinfático y en la escala timpánica, iniciando el proceso de fibrosis (78). La expresión de ligando Fas en las células cocleares, en respuesta a mediadores de la inflamación

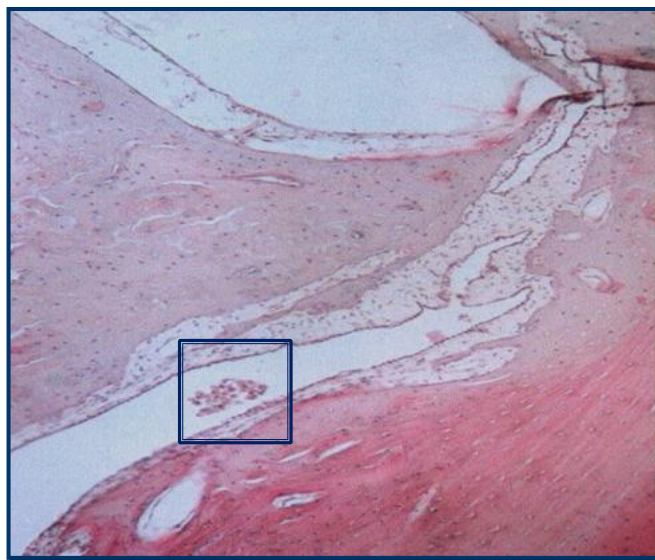


Figura 1.3 Células del infiltrado inflamatorio del lumen del saco endolinfático (hematoxilina-eosina; 100x).

coclear como el interferon γ (INF- γ) expresado por los linfocitos T, puede contribuir a limitar la respuesta inmune coclear y proteger al oído interno del daño autoinmune (79). Las células que expresan interleucina 1 (IL-1) se observan más tarde (a las 6 horas) (76, 77). Las concentraciones de IL-1 en sangre periférica aumentan enormemente durante la inflamación del oído interno y paralelamente aumenta la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión celular vascular (VCAM) y la molécula de adhesión intercelular (ICAM, MAIC) en la vénula modiolar espiral, en las vénulas

colectoras y en el epitelio del saco endolinfático, lo que facilita la infiltración linfocitaria en la escala timpánica (80, 81). Además de expresar estas moléculas de adhesión, las células endoteliales secretan IL-1, IL-6 y TNF- α promoviendo así una vasculitis y contribuyendo al daño inmunomediado (82). Finalmente la lesión en los fibrocitos del ligamento espiral que expresan Na⁺-K⁺ adenosina trifosfatasa (Na⁺-K⁺ ATPasa) contribuye a la disfunción coclear por alteración de la homeostasis del K⁺ (83, 84) (figura 1.4).

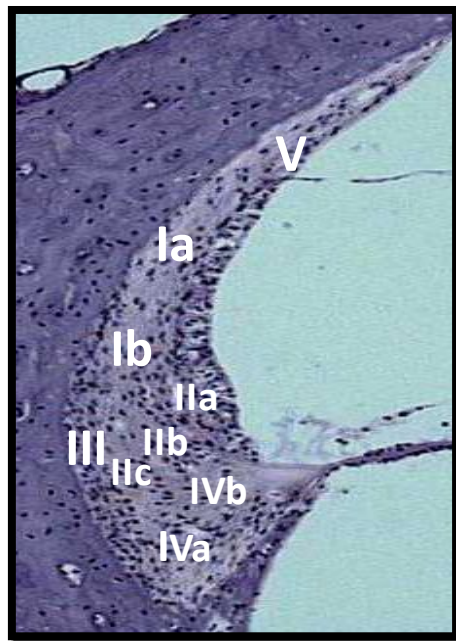


Figura 1.4 Corte de la pared lateral de la cóclea del cobaya en la que se muestra la localización de los diferentes tipos de fibrocitos (azul de toluidina, 10x). Los fibrocitos tipo I realizan un transporte pasivo de K⁺ desde los fibrocitos tipo II, IV y V. Los fibrocitos tipo II (especialmente los tipo IIb) realizan un bombeo activo de K⁺ a la endolinfa desde la perilinfa a través de las células del surco externo. Los fibrocitos tipo IV y V realizan un bombeo activo de K⁺ a la endolinfa desde la perilinfa de la rampa timpánica y vestibular respectivamente.

La extravasación de leucocitos a la rampa timpánica conduce a la formación de matriz fibrosa y granuloma. El proceso inflamatorio finalmente se resuelve en 4-6

semanas con la osteoneogénesis coclear y la apoptosis de las células inflamatorias (85, 86) (figura 1.5).

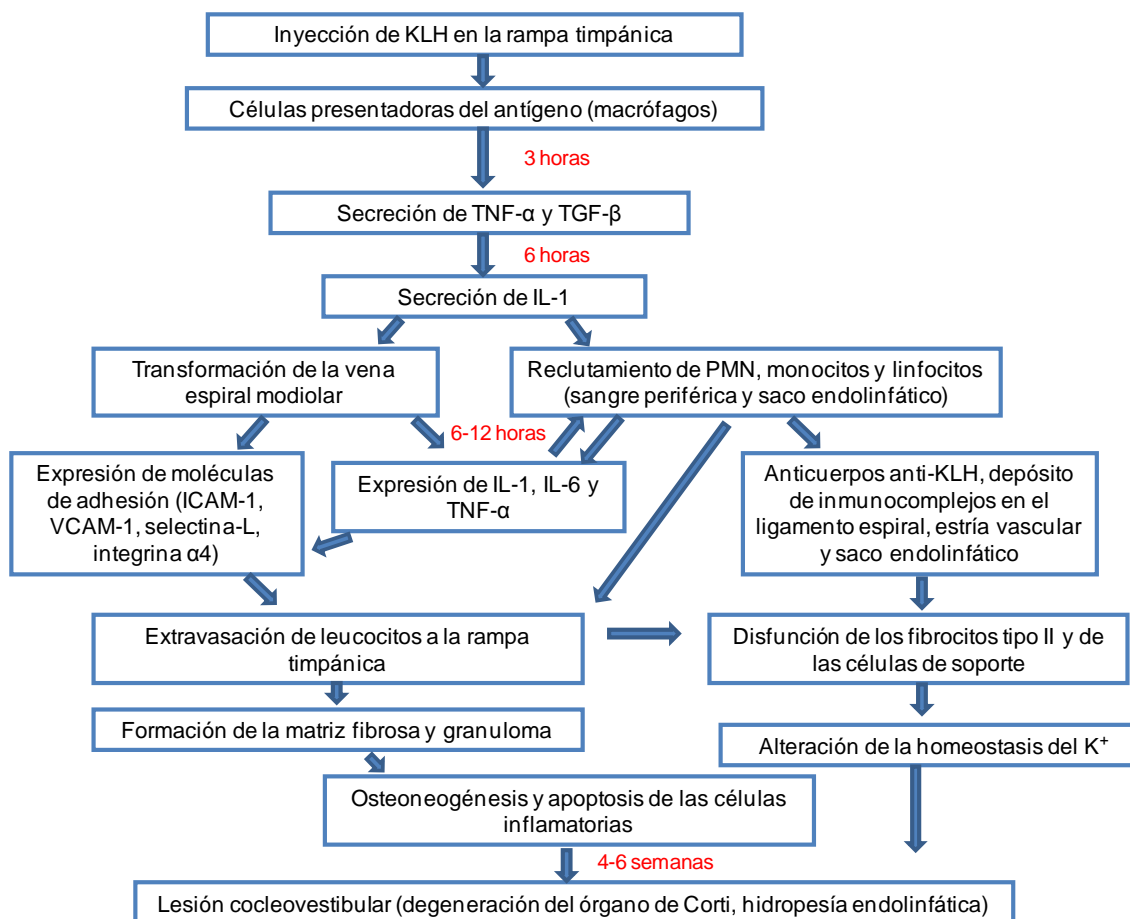


Figura 1.5 Secuencia inmunopatológica en la laberintitis experimental por KLH.
Modificada de García-Berrocal JR (87).

1.8.3. Inmunopatología

Aunque el oído interno no puede ser biopsiado para evaluar mejor la patología del mismo, en los casos en los que se ha podido estudiar el hueso temporal en humanos con enfermedad autoinmune (granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, síndrome de Cogan y lupus), se han descrito hallazgos relacionados con dos mecanismos patogénicos distintos: 1) fibrosis y osteogénesis que aparecen en los

estadios finales de la inflamación, y 2) cambios isquémicos y atrofia celular en ausencia de inflamación secundarios a una vasculopatía inespecífica (55, 88-90).

1.9. PRESENTACIÓN CLÍNICA

La descripción original del cuadro clínico por parte de McCabe recogía los datos de 18 pacientes con hipoacusia neurosensorial bilateral, lentamente progresiva y no fluctuante, asociada a parálisis facial y destrucción tisular en casi un 25% de los casos (4). En cambio, los pacientes apenas presentaban vértigo. Hughes y colaboradores en 1984 ampliaron esta descripción con nuevas observaciones: la EIOI puede presentarse de forma aislada (EIOI primaria) o asociada a otro trastorno autoinmune sistémico (EIOI secundaria) (5). De hecho, hasta el 30% de los pacientes con EIOI presentan una enfermedad autoinmune sistémica (91). Además la EIOI puede presentarse al principio como una sordera súbita, seguir un curso fluctuante y acompañarse de vértigo hasta en un 50% de los casos, en muchas ocasiones indistinguible de una enfermedad de Menière (92).

En general se reconocen 3 formas clínicas de presentación, que a menudo dependen del momento evolutivo de la enfermedad: sordera súbita, hipoacusia rápidamente progresiva e hipoacusia fluctuante (15). Con el tiempo en la EIOI se termina afectando ambos oídos y la evolución es hacia un progresivo deterioro de la audición, si no se establece un diagnóstico y tratamiento adecuado.

Estas manifestaciones son suficientemente inespecíficas como para poder incluir la mayor parte de las afecciones del oído interno; por tanto, es necesario establecer unos criterios clínicos diagnósticos que orienten hacia la aplicación de un tratamiento (93).

1.10. DIAGNÓSTICO DE LA EIOI

1.10.1. Diagnóstico clínico

Aunque las enfermedades autoinmunes localizadas como el pénfigo (94) o las vasculitis cutáneas (95) se diagnostican mejor mediante estudio por inmunofluorescencia de tejido obtenido mediante biopsia, en el caso de la EIOI esto no es posible, ya que una biopsia del oído interno supondría la destrucción del órgano y su función.

El diagnóstico se basa fundamentalmente en la evaluación clínica, la demostración de una hipoacusia neurosensorial progresiva en controles audiométricos realizados periódicamente y en la respuesta al tratamiento con fármacos inmunomoduladores, como los corticosteroides, aunque dicha respuesta es muy variable.

Una vez descartadas otras causas de hipoacusia neurosensorial, se realiza una batería de pruebas inespecíficas comunes al estudio de otras enfermedades autoinmunes: hemograma, bioquímica, velocidad de sedimentación globular (VSG), etc.

En algunos casos, los estudios serológicos pueden detectar algunos autoanticuerpos específicos; sin embargo, no existen pruebas serológicas o inmunológicas lo suficientemente sensibles y específicas para establecer un diagnóstico definitivo (96, 97).

1.10.2. Pruebas inmunológicas

Se han ensayado numerosas pruebas diagnósticas. Algunas pruebas de inmunidad celular como la prueba de inhibición de la migración linfocitaria propuesta por McCabe (89, 98) o la prueba de transformación linfocitaria propuesta por Hughes y colaboradores (99, 100) nunca han sido adecuadamente validadas. Durante la década de los 90 del siglo pasado, los avances en el conocimiento de las respuestas celular y

Tabla 1.2 Autoanticuerpos específicos e inespecíficos presentes en pacientes con EIOI y en modelos animales de laberintitis estéril

Autoanticuerpos específicos
Colágeno tipo II
Colágeno tipo IX
Coclina
DEP-1/CD 148
KHRI-3
Proteína de la mielina P0
Raf-1
betatectorina
betaactina
Conexina 26

Autoanticuerpos no específicos
Anticuerpos antinucleares (ANA)
Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA)
Anticuerpos anti células endoteliales (AECA)
Factor reumatoide
Proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP-70)
Anticuerpos antifosfolípidos/anticardiolipina
Anticuerpos antitiroideos

humoral del oído interno, así como la utilización de diversos modelos de laberintitis experimental autoinmune, permitieron identificar numerosos autoanticuerpos presuntamente implicados en la respuesta autoinmune frente al oído interno. La tabla 1.2 muestra una lista detallada de autoanticuerpos específicos e inespecíficos estudiados en modelos animales y en pacientes con EIOI (48, 70, 74, 96, 101-110).

Muchos de estos autoanticuerpos se probaron como posibles marcadores serológicos: anticuerpos frente al colágeno tipo II (101), anti células

endoteliales (108, 111), anti glicolípidos sulfoglucuronosilados o anti proteína mayor periférica de la mielina P0 (112, 113). También se estudió el papel de los inmunocomplejos en la EIOI (114, 115), o los cambios en las poblaciones linfocitarias en sangre periférica (14, 116, 117).

1.10.3. Western blot

Harris propuso la técnica de Western blot para demostrar anticuerpos específicos frente a antígenos del oído interno en animales inmunizados con antígenos heterólogos del oído interno y en pacientes con hipoacusia neurosensorial (118). Este abordaje permitió identificar muchos anticuerpos de diferente peso molecular. De éstos el más

estudiado ha sido un anticuerpo que se une a un antígeno de 68 kD derivado de un extracto de hueso temporal bovino y a la forma inducible de la proteína de choque térmico 70 (HSP-70, *heat shock protein*) (109, 119-121). Las HSP son ubicuas y se expresan en numerosos tejidos y en diversas situaciones, como por ejemplo tras un estrés ambiental, infecciones o asociadas a una respuesta inflamatoria. La HSP-70 aparece ligada a diversos procesos patológicos del oído interno, como un marcador de daño celular precoz, pero inespecífico (122). En la EIOI la frecuencia de anticuerpos frente a las HSP no difiere en pacientes y en controles (123, 124), por lo que no resultan útiles en el diagnóstico de la EIOI. Por otro lado, ratones inmunizados con HSP-70 producen Ac anti HSP-70, sin que se observe una pérdida auditiva, por lo que estos Ac no estarían directamente implicados en la patogenia de la EIOI (125). No obstante, para algunos autores, estos Ac podrían tener un papel como indicadores de actividad de la enfermedad y de respuesta al tratamiento (109, 120).

La presencia de un resultado positivo con la prueba de Western blot no confirma ni descarta el diagnóstico de EIOI (124). Además, la mayoría de estas pruebas no han tenido una difusión importante en la práctica clínica (tabla 1.3).

1.10.4. Estudios de imagen

Por último, también se estudió el valor de la tomografía por emisión de positrones (TEP) en el diagnóstico de la EIOI. Si bien los primeros estudios mostraban cierta utilidad, ésta no se verificó en estudios posteriores (126).

Tabla 1.3 Pruebas diagnósticas propuestas para la EIOI

Prueba diagnostica EIOI	Autor principal	Año	Sensibilidad	Especificidad
Western blot 68 kDa	Moscicki ¹⁰⁹	1994	0,87	0,67
	Rauch ¹¹⁰	1995	0,47	
	Disher ⁷³	1997	0,47-0,52	
	García-Berrocal ⁹⁶	2002	0-0,17	0,67-1
	Loveman ⁹¹	2004	1	0,3
	Mazlumzadeh ¹²⁶	2004	0,6	0,8
	Zeitoun ¹²⁷	2005	0,75	0,37
Inmunofluorescencia (IF) 68kDa	Disher ⁷³	1997	0,47-1	
IF 68-72 kDa	Zeitoun ¹²⁷	2005	0,89	0,37
Western blot + IF			0,68	0,26
Western blot 27, 45, 50, 68, 80 kDa	Veldman ¹²⁸	1993	0,5-0,75	0,73-1
Western blot hsp 70	Hirose ¹²⁹	1999	0,42	0,9
Western blot 33, 35, 68, 220 kDa	García-Callejo ¹³⁰	2003	0,43	0,85
Inmunocomplejos	Brookes ¹³¹	1985	0,93	0,97
Anticuerpos anti colágeno tipo II	Helfgott ¹⁰¹	1991	0,78	0,11
Anticuerpos anti parvovirus humano B19	Cotter ¹³²	1994	0,82	0,31
Resonancia magnética (RM)	Zavod ⁵²	2000	0,03	
HLA DR4 –			0,68	
HLA cw7+			0,41	
HLA cw4 +			0,31	
HLA B35			0,19	
Péptido de Cogan	Lunardi ⁴⁸	2002	1	1
ELISPOT linfocitos T	Lorenz ¹³³	2002	0,25	1
Anticuerpos anti endotelio	Cadoni ¹⁰⁸	2002	0,68	
TEP	Mazlumzadeh ¹²⁶	2004	0,8	0,8
VSG, FR, ANAs	Zeitoun ¹²⁷	2005	0,39	0,43
ANAs	García-Berrocal ⁹⁶	2002	0,17-0,5	0,22-0,71

Modificada de Lobo D *et al.* (97). IF: inmunofluorescencia; HSP70: proteína de choque térmico 70; RM: resonancia magnética; HLA: antígeno leucocitario humano; ELISPOT: análisis de inmunoabsorción enzimática; TEP: tomografía por emisión de positrones; VSG: velocidad de sedimentación globular; FR: factor reumatoide; ANAs: anticuerpos antinucleares.

1.10.5. Perfiles diagnósticos

Debido al espectro clínico tan amplio de la EIOI y a la dificultad de realizar muchas de estas pruebas, ha habido diversos intentos de definir un perfil de sospecha de EIOI (134). Estos perfiles tienen en cuenta la presentación clínica, los resultados de pruebas serológicas inespecíficas (VSG, niveles de complemento, proteína C reactiva, etc) así como el de análisis inmunológicos específicos (135) (tabla 1.4).

Estos abordajes diagnósticos podrían contribuir a ahorrar costes, al restringir la realización de pruebas diagnósticas a aquellas que son realmente coste-efectivas (135) (tabla 1.5).

Tabla 1.4 Perfil diagnóstico en la EIOI. Se sospecha una EIOI cuando se cumplen tres criterios mayores o bien dos mayores y dos menores. Modificado de García-Berrocal JR *et al.* (134)

CRITERIOS MAYORES
Hipoacusia bilateral
Enfermedad autoinmunitaria sistémica
ANA > 1:80
Disminución de células T nativas (CD4CD45RA)
Tasa de recuperación auditiva > 80%
CRITERIOS MENORES
Hipoacusia unilateral
Paciente joven o de mediana edad
Mujer
Tasa de recuperación auditiva < 80%

Tabla 1.5 Costes de algunas pruebas diagnósticas en la EIOI. Modificado de García-Berrocal JR *et al.* (135)

Test	Coste (€)
Hemograma	18,08
Velocidad de sedimentación globular	15,60
Anticuerpos antinucleares	22,55
Inmunoglobulinas IgA, IgG, IgM	16,54
Western blot frente a la HSP-70	41,47
Inmunofenotipo de linfocitos sanguíneos periféricos	30,56
Factores del complemento C3 y C4	41,35
Anticuerpo fluorescente antitreponema	55,60
Audiometría	90,22
Resonancia magnética	676,69

1.10.6. EIOI en las enfermedades autoinmunes sistémicas

En algunos pacientes la hipoacusia neurosensorial es el primer síntoma de una enfermedad autoinmune sistémica. En estos casos la aparición de otros síntomas así como la presencia de autoanticuerpos: factor reumatoide (FR), anticuerpos antinucleares (ANAs), anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA), anticuerpos anticélulas endoteliales (AECAs), antifosfolípidos, antitiroglobulina, antiperoxidasa, etc, nos puede orientar en el diagnóstico.

En pacientes con artritis reumatoide (AR) o con LES se ha demostrado una hipoacusia neurosensorial en el 70%, cuando se estudia la audición mediante audiometría de altas frecuencias, y esta pérdida auditiva se correlaciona con la presencia de anticuerpos anticardiolipina y crioglobulinas séricas (136).

1.11. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial se establece con la sordera súbita, la enfermedad de Menière, la otosífilis (137), el neurinoma acústico, y más raramente con la meningitis, la esclerosis múltiple, con algunas enfermedades oncológicas (metástasis, linfoma) que cuando afectan a la duramadre pueden manifestarse como una hipoacusia neurosensorial rápidamente progresiva, con algunas formas de sordera genética como la sordera neurosensorial no sindrómica autosómica dominante DFNA-16 (que aparece en personas jóvenes y responde a glucocorticoides) (138, 139) o con algunas enfermedades autoinflamatorias como el síndrome de Muckle-Wells, que presenta un cuadro clínico similar al de algunas enfermedades autoinmunes sistémicas, pero no responde a los corticosteroides y tiene un origen genético (140-144).

1.12. RETOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA EIOI

La EIOI continúa representando un reto diagnóstico, ya que no existen marcadores completamente específicos. La falta de un diagnóstico netamente definido puede conducir a tratar pacientes que no presentan una EIOI, y por lo tanto, a una ausencia de respuesta al tratamiento, como sucede con las enfermedades autoinflamatorias: síndrome de Muckle Wells y síndrome CINCA (crónico, infantil, neurológico, cutáneo y articular) (143, 144).

Los datos aportados por el laboratorio general, mucho más sencillos y menos costosos de obtener, tienen la capacidad de establecer la existencia de actividad inflamatoria, independientemente del agente causal (inflamación autoinmune o inflamación secundaria a complicaciones infecciosas) pero carecen de la especificidad demostrada por los métodos inmunológicos para el establecimiento del diagnóstico. Entre estos métodos, la demostración de linfocitos T autorreactivos sigue estando fuera de la capacidad de la mayoría de laboratorios clínicos de inmunología. En cambio, debido a la facilidad de determinar autoanticuerpos en el suero, la búsqueda de autoanticuerpos específicos es esencial para mejorar el diagnóstico de la EIOI.

Pero existen algunas limitaciones ya que desde el punto de vista del diagnóstico de laboratorio los autoanticuerpos son relativamente frecuentes en humanos sin enfermedad autoinmune. Esto implica que únicamente se les puede dar un significado clínico a los autoanticuerpos que se presentan con niveles claramente superiores a los del umbral establecido empíricamente.

Resulta difícil establecer el carácter autoinmunitario de una enfermedad humana, y existen muy pocas enfermedades para las cuales se haya obtenido evidencia directa, o incluso, indirecta. Sin embargo, los autoanticuerpos siguen teniendo un gran valor para el diagnóstico ya que su asociación con una enfermedad depende más de las evidencias

estadísticas y epidemiológicas que de una relación causa-efecto. Los autoanticuerpos pueden no ser la causa de la enfermedad o pueden no contribuir en absoluto al desarrollo de la enfermedad y seguir siendo marcadores fiables de la enfermedad. En la EIOI es necesario identificar autoanticuerpos que puedan actuar como marcadores de determinados subgrupos de pacientes que difieren en el pronóstico o en la respuesta a la terapia.

La utilidad de estas pruebas se vería enormemente potenciada por el desarrollo de mediciones cuantitativas que permitieran al clínico seguir los títulos de anticuerpos en controles periódicos repetitivos.

1.13. TRATAMIENTO DE LA EIOI

Desde la descripción de esta enfermedad el tratamiento más utilizado han sido los corticoides. Constituyen el “Gold Standard” en el tratamiento de la EIOI, por lo que cualquier otro tratamiento que se vaya a utilizar debe probar su eficacia respecto a los corticoides (145).

Se han utilizado diferentes criterios de respuesta. En general se considera una respuesta positiva al tratamiento una mejoría de 10 a 15 dB en al menos una o dos frecuencias en la audiometría tonal liminar, o del 10 al 20% en el reconocimiento de palabras. Otros criterios de respuesta para algunos autores serían la estabilización de la audición (146) o el control de las crisis vertiginosas a largo plazo (147).

1.13.1. Corticoides

Mecanismo de acción

El efecto inmunoregulador de los corticoides se debe fundamentalmente a su capacidad de bloquear la función de determinados factores de transcripción como el

factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de los linfocitos B activados (NF-kB) y la proteína activadora 1 (AP-1) que juegan un papel crucial en la expresión de citocinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos (IL-1 β y TNF- α) y de los linfocitos T (IL-2) (148-150). Otros mecanismos de acción se muestran en la Tabla 1.6. Algunos de estos mecanismos podrían ser no sólo cuantitativamente sino cualitativamente distintos en el tratamiento con bolos intravenosos de metil-prednisolona comparado con la terapia por vía oral (151).

Tabla 1.6 Actividad antiinflamatoria e inmunorreguladora de los glucocorticoides.
Mecanismo de acción de los pulsos intravenosos de metil-prednisolona

Mecanismos de acción de los glucocorticoides	
Actividad antiinflamatoria	Disminución de la síntesis de prostaglandinas Inhibición de la síntesis de metaloproteasas (colagenasa, elastasa) y activador del plasminógeno Inhibición de la migración de los neutrófilos Inhibición de la quimiotaxis y fagocitosis de los macrófagos Estabilización de la membrana lisosomal Inhibición de la actividad fosfolipasa Bloqueo del tránsito de inmunocomplejos
Actividad inmunorreguladora	Inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF) Inhibición de la producción de IL-2, INF- α , INF- γ Disminución del número de monocitos circulantes Inhibición de la producción de linfocitos T cooperadores Inhibición de la proliferación de linfocitos in vitro Inducción de apoptosis en linfocitos CD8+ in vitro Reducción de la síntesis de inmunoglobulinas Inhibición de los receptores Fc y C3 Reducción de la respuesta mediada por linfocitos B Alteraciones transitorias en la actividad "natural killer"
Pulsos intravenosos de metil-prednisolona	Inhibición de la agregación leucocitaria Disminución de expresión del receptor de IL-2 en linfocitos T Alteraciones prolongadas en la actividad "natural killer" Aumento de la fagocitosis mediada por el receptor Fc

Fc: fragmento cristalizable (del anticuerpo); C3: factor 3 del sistema del complemento.

Pauta de tratamiento

La toxicidad de los corticoides depende de la dosis y duración del tratamiento. Por ello, se intenta mantener al paciente con la dosis mínima efectiva y durante el periodo de tiempo más corto posible. La pauta inicial más utilizada es de 60 mg o 1

mg/kg/día de prednisona o 6-metilprednisolona durante 1 mes, ya que pautas más cortas o con dosis más bajas se han demostrado ineficaces y aumentan el riesgo de recaída (152). En las formas rápidamente progresivas se mantiene una pauta de 1 mg/kg/día durante 4 semanas, manteniendo la dosis hasta que el audiograma se estabiliza y disminuyendo la dosis paulatinamente a lo largo de 8 semanas hasta la dosis de mantenimiento de 10-20 mg/día durante otras 6 semanas. En las formas súbitas se administra 1 mg/kg/día de 6-metilprednisolona en pauta descendente durante 4 semanas. En sorderas severas (pérdida mayor de 70 dB) se administran 3 pulsos de 500 mg y a continuación se aplica la pauta anterior. En pacientes que reciben altas dosis de corticoides se debe descartar la presencia de tuberculosis activa, realizar controles de glucemia, potasio y medir la tensión arterial de forma periódica. Así mismo está contraindicada la administración de vacunas con virus atenuados.

La reducción de la dosis se realiza de forma gradual, más despacio si se ha mantenido el tratamiento con glucocorticoides a altas dosis durante más tiempo.

Efectos secundarios

En pacientes con EIOI apenas se han observado efectos adversos graves (0-0,9%) (153-155), aunque pueden ser algo más frecuentes cuando se realiza un tratamiento con pulsos intravenosos de corticoides a dosis elevadas. El porcentaje global de efectos secundarios no supera el 7,8% (155). En la tabla 1.7 se muestran los efectos secundarios más frecuentes de los glucocorticoides, subrayando aquellos que han sido observados en pacientes con EIOI.

Tabla 1.7 Efectos secundarios de los glucocorticoides

Toxicidad relacionada con los glucocorticoides	
Toxicidad metabólica	Obesidad
	Hiperglucemia *
	Diabetes
	Hiperlipemia
	Hipopotasemia
	Retención hidrosalina
Endocrinológicos	Supresión del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal*
	Retraso del crecimiento
	Amenorrea secundaria y transtronos menstruales
Toxicidad dermatológica	Acné, estrías
	Hirsutismo, alopecia
	Atrofia cutánea, equimosis, púrpura esteroidea
	Retraso en la cicatrización de heridas
Toxicidad gastrointestinal	Úlcera péptica, perforación intestinal *
	Pancreatitis, esteatosis hepática
	Hemorragia gastrointestinal
Toxicidad musculoesquelética	Miopatía, osteoporosis, osteonecrosis *
	Rotura tendinosa, artritis, artralgias transitorias
	Síndrome de supresión de corticoides
Toxicidad neuropsiquiátrica	Depresión
	Psicosis
	Pseudotumor cerebral
	Convulsiones
Toxicidad ocular	Catarata subcapsular posterior
	Glaucoma
Toxicidad cardiovascular	Hipertensión arterial
	Arterioesclerosis acelerada
	Muerte súbita, arritmia ventricular
Reacciones de hipersensibilidad	Urticaria
	Anafilaxia
Otros	Aumento de la incidencia de infecciones

* Aunque muy raramente se presentan, en color tierra se destacan algunos efectos adversos observados en pacientes con EIOI.

Algunos pacientes no responden a los corticoides o bien requieren altas dosis para controlar su enfermedad, por lo que se han probado otros inmunosupresores como el metotrexato o la ciclofosfamida. La base empírica para el uso de estos agentes citotóxicos es la constatación de que en algunos casos su efecto refuerza el de los corticoides, bien obteniendo la remisión de uno o varios síntomas que no podía alcanzarse sólo con corticoides, bien permitiendo disminuir la dosis de corticoides necesaria para mantener al paciente asintomático.

1.13.2. Metotrexato

Mecanismo de acción

El metotrexato es un antagonista del ácido fólico. Tiene una gran afinidad por la enzima citoplasmática dihidrofólico reductasa. Inhibe la síntesis de los nucleótidos purínicos, pirimidínicos, del ADN y el ARN. De esta forma impide la proliferación de los linfocitos T activados. También inhibe la enzima timidilato sintetasa y la transformilasa del ribonucleótido de 5-aminoimidazol-4-carboxiamida, acción que conduce a la acumulación de este ribonucleótido y de adenosina, la cual tiene propiedades antiinflamatorias (156).

Pauta de tratamiento

La dosis más empleada es de 7,5 mg semanales, administrados en una única toma. En el tratamiento de ataque se usa la vía parenteral: subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.) o endovenosa (i.v.). Una vez se alcanza la respuesta esperada se pasa a utilizar la vía oral, manteniendo generalmente una dosis de 15 mg semanales durante 12 meses. Antes de iniciar el tratamiento, se aconseja realizar una radiografía de tórax y pruebas de serología frente al virus B y C de la hepatitis.

En un metaanálisis se demostró que el metotrexato no aportaba ningún beneficio frente al uso aislado de corticoides en el control de la audición (153). Sin embargo, se logra una mejoría del vértigo o la inestabilidad en los pacientes que lo presentan, con tratamientos mantenidos a largo plazo (147).

Efectos secundarios

El metotrexato produce toxicidad hemática (leucopenia, trombopenia), hepática (elevación de enzimas hepáticas, fibrosis periportal, cirrosis) y gastrointestinal (náuseas, vómitos, mucositis) (157).

La adición de suplementos de ácido fólico disminuye la aparición de efectos secundarios y preserva la eficacia del metotrexato, por lo que se recomienda su uso (158).

1.13.3. Ciclofosfamida

Mecanismo de acción

Es un agente alquilante, sintetizado en 1958. Actúa sobre el ciclo celular reaccionando con los centros nucleofílicos de las moléculas de ADN, ARN y proteínas. Al unirse al ADN inhibe su replicación. Tiene efectos tóxicos sobre los tejidos linfoides rápidamente proliferantes, induce tolerancia inmunológica, inhibe la función celular supresora, disminuye la producción humoral de anticuerpos y provoca una supresión de la función de la médula ósea.

Pauta de tratamiento

Se administra tanto por vía oral como intravenosa. La dosis oral es de 1 a 2 mg/kg/d durante 4 a 6 semanas. Por vía intravenosa se comienza con 0,75 g/m² o 0,5

g/m² si el filtrado glomerular es inferior a un tercio de la normalidad y se repite cada uno a tres meses. En general, debe intentarse que la cifra de leucocitos no descienda por debajo de los 2000/mm³ y que la cifra de neutrófilos se mantenga por encima de 1000/mm³ (159).

Efectos secundarios

Los efectos secundarios más importantes de la ciclofosfamida son la toxicidad gonadal, sobre la vejiga urinaria y medular.

1.13.4. Otros citotóxicos

También se han utilizado la azatioprina, la leflunomida y el micofenolato mofetilo en el tratamiento de la EIOI aunque no se han realizado estudios controlados para evaluar su eficacia (159-161).

1.13.5. Plasmaféresis

La plasmaféresis es un procedimiento que permite separar la sangre en sus dos componentes, celular y plasmática y así eliminar algunos componentes del plasma como son los anticuerpos antes de transfundir al paciente de nuevo las células y el plasma.

En un estudio a largo plazo en pacientes con EIOI se observó que el 50% lograban una mejoría o estabilización de su audición tras recibir tratamiento de plasmaféresis (162).

■NOVEDADES EN EL TRATAMIENTO DE LA EIOI

La tasa de respuesta global a los corticosteroides es del 60%, y esta respuesta es muy variable: algunos pacientes mejoran sus umbrales de audición y la discriminación mientras que otros sólo mejoran en alguno de estos aspectos (163). Por otro lado,

pacientes con fluctuaciones de la audición y progresión de la pérdida auditiva antes de recibir tratamiento, pueden mostrar después del tratamiento una estabilización de la audición sin obtener una mejoría de la misma (146). Además, aunque en la mayoría de los pacientes respondedores se logra disminuir la dosis de corticoides o incluso suprimirlos sin sufrir una recaída, en otros pacientes, especialmente niños (164), se puede presentar una pérdida auditiva dependiente de corticosteroides. Finalmente, la pérdida auditiva se vuelve en ocasiones refractaria al tratamiento con corticosteroides, siendo necesario considerar en estos casos la utilización de otros fármacos inmunosupresores. Además, pueden aparecer efectos secundarios inaceptables con el tratamiento (gastritis, úlcera gastroduodenal, retención hidrosalina, intolerancia a la glucosa, diabetes, necrosis avascular de la cabeza femoral, problemas psiquiátricos, trastornos del sueño, cataratas, osteoporosis, hábito cushingoide...). Todo ello hace necesaria la búsqueda de nuevos fármacos y otras vías de administración como la intratimpánica.

1.14. TRATAMIENTO INTRATIMPÁNICO

La utilización de corticoides intratimpánicos es un abordaje terapéutico muy atractivo porque es mínimamente invasivo y, al permitir una aplicación más directa del fármaco al oído afecto, se minimizan los efectos secundarios. Sin embargo, no hay consenso sobre la dosis que se debe administrar y la duración del tratamiento; además, no es fácil controlar la dosis que realmente llega al oído interno (parte se absorbe en el oído medio y parte se elimina a través de la trompa de Eustaquio) y su eficacia aún no ha sido totalmente determinada (165).

1.14.1. Farmacocinética de los glucocorticoides en el oído interno

Diferentes estudios en animales han mostrado la viabilidad de esta ruta de administración de los glucocorticoides. Éstos penetran en el oído interno a través de la ventana redonda, que está formada por una lámina epitelial externa, una lámina de tejido conjuntivo intermedia y una lámina epitelial interna, estructura que es más permeable que la barrera hemato-laberíntica. La capacidad que tienen distintas sustancias de atravesar la ventana redonda depende de su tamaño, carga eléctrica y del grosor de la ventana redonda (166). En la práctica clínica los glucocorticoides se administran a través de una inyección intratimpánica al oído medio. Para determinar la eficacia de estas inyecciones intratimpánicas como método de administración de los glucocorticoides al oído interno, se ha estudiado la farmacocinética de la hidrocortisona, metilprednisolona y dexametasona en los fluidos cocleares, comparando estos resultados con los que se obtienen cuando se administran por vía oral o intravenosa (167). Tras la administración intratimpánica, se alcanzaron niveles de los tres medicamentos en el oído interno significativamente superiores a los obtenidos tras la administración sistémica. Se observaron concentraciones similares de los tres medicamentos en la perilinfa (escala vestibular y timpánica), lo que indica una libre comunicación entre estos compartimentos. En la endolinfa se obtuvieron unos niveles más elevados, lo que parece indicar que existe un transporte activo de estos fármacos. De los tres, la metilprednisolona es la que obtuvo la concentración más alta y más prolongada, tanto en la endolinfa como en la perilinfa.

Por otra parte, algunas sustancias como la histamina pueden facilitar la absorción de estos fármacos, al aumentar la permeabilidad de la ventana redonda (168).

Los corticoides producen una vasodilatación con aumento del flujo sanguíneo coclear (169), lo que también puede tener un efecto terapéutico al atenuar la

disminución del flujo sanguíneo coclear producido por radicales libres de oxígeno y proteger las células de la estría vascular de un daño anóxico adicional. Este mecanismo también ha sido descrito en la ototoxicidad por cisplatino (170).

1.14.2. Estudios clínicos

No se han realizado muchos estudios clínicos que analicen la utilidad de los corticoides intratimpánicos en el tratamiento de la EIOI. En un estudio con 46 pacientes, de los cuales 5 presentaban EIOI, se obtuvo una mejoría de los umbrales de discriminación verbal del 8 al 20% en 4 de esos 5 pacientes. No se observó mejoría en los umbrales de la audiometría tonal en ninguno de ellos (171).

En otro estudio con 37 pacientes, uno de ellos presentaba EIOI. Los corticoides intratimpánicos no fueron eficaces a la hora de controlar el número de episodios, aunque sí fueron eficaces en restituir la pérdida auditiva en cada uno de los episodios (167).

En otro estudio con 16 pacientes que presentaban pobre respuesta a los corticoides sistémicos o recurrencias, se examinó la respuesta a los corticoides intratimpánicos. Ocho pacientes fueron tratados con corticoide intratimpánico, tres con metotrexato y metilprednisolona intratimpánica, y el resto sólo con metotrexato. De los ocho pacientes tratados sólo localmente, cinco mejoraron su audición, uno no presentó cambios y dos empeoraron. Todos los pacientes de este grupo que presentaban síntomas vestibulares (7 pacientes) mejoraron de estos síntomas. Dos de los tres pacientes tratados con la combinación de ambos fármacos mejoraron su audición (147).

En un futuro próximo esta vía podría ser utilizada para vehicular otros fármacos y tratar diversas enfermedades del oído interno además de la EIOI.

1.15. TERAPIAS BIOLÓGICAS

Se ha comenzado a ensayar de forma prometedora terapias biológicas que ya son utilizadas en el contexto de otras enfermedades autoinmunes con una gran eficacia y escasos efectos adversos (172). Las nuevas terapias biológicas han mejorado notablemente el manejo y el pronóstico de enfermedades autoinmunes como la AR, la espondilitis anquilopoyética, la psoriasis, la colitis ulcerosa, etc, y sus indicaciones se han ido ampliando con el tiempo (véase tabla 1.8 más abajo). Existen numerosos agentes biológicos en distintas fases de experimentación, debido a los éxitos que se obtienen con ellos en los modelos experimentales.

1.15.1. Definición de terapia biológica

Los agentes biológicos son proteínas de fusión (proteínas elaboradas a partir de un gen de fusión, que se crea al unir partes de dos o más genes distintos) o anticuerpos monoclonales creados para bloquear componentes específicos de la cascada inflamatoria. Según la FDA (*Food and Drug Administration*), se denominan agentes biológicos aquellos agentes sintetizados a partir de productos de organismos vivos aplicables al diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad o condición de los seres humanos.

1.15.2. Clasificación de las terapias biológicas

Las terapias biológicas se clasifican según sus mecanismos de acción (inhibidores del TNF- α , antagonistas de la IL-1, etc). La parte final de cada uno de los nombres de estas moléculas hace referencia a su estructura:

“-cept” indica que se ha fusionado un receptor a la región Fc de la Ig G1 humana.

“-mab” indica que se trata de un anticuerpo monoclonal (producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B, descendiente de una única célula madre, con una célula plasmática tumoral).

“-ximab” indica que se trata de un

anticuerpo quimérico (molécula artificial en la cual las porciones constantes de las cadenas pesada y ligera provienen de una Ig humana, y las regiones variables VH y VL son obtenidas de un anticuerpo monoclonal murino).

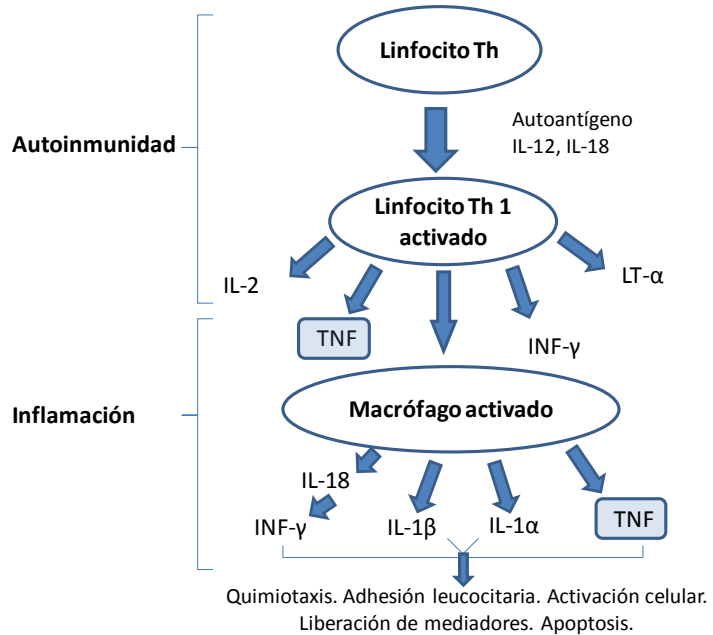


Figura 1.6. Respuesta inmunológica. Participación del TNF en los procesos inflamatorios y autoinmunes.

1.15.3. Inhibidores del TNF- α

Dentro de las terapias biológicas los inhibidores del TNF han sido los más utilizados. El TNF es una citocina proinflamatoria producida por múltiples células, especialmente macrófagos, que promueve la inflamación activando los macrófagos, estimulando la maduración y la migración de las células dendríticas, activando los neutrófilos y las células NK, aumentando la permeabilidad vascular, etc. Fue aislado por primera vez en 1975 por Carswell *et al.* en un intento de identificar los factores responsables de la necrosis del sarcoma Meth A (173) (figura 1.6).

Se ha observado que se expresa en diferentes estructuras del oído interno de forma precoz durante la respuesta inflamatoria. Es secretado por macrófagos,

monocitos, linfocitos B y T, y por fibroblastos del ligamento espiral y estimula la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS/NOS II) en la cóclea de cobaya con posibles efectos neurotóxicos en el oído interno (174).

Las células disponen de dos receptores específicos para el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el p55 TNF-R y el p75 TNF-R. Se han desarrollado diversos agentes específicos contra el TNF- α : anticuerpos monoclonales dirigidos contra el TNF- α quiméricos (infiximab), humanizados (CDP571) o humanos (adalimumab) y moléculas portadoras de fracciones solubles del receptor del TNF- α , p75 (etanercept) y p55 (onercept). De los enumerados, en España se comercializan infiximab, etanercept y adalimumab.

Se aconseja el cribado con radiografía de tórax o con prueba de Mantoux antes de iniciar el tratamiento con inhibidores del TNF- α ya que el TNF- α es un componente clave de la defensa del organismo frente al *M. tuberculosis* y otras enfermedades granulomatosas. Aunque es muy poco frecuente, los inhibidores del TNF- α pueden inducir un lupus eritematoso sistémico.

1.15.3.1. Etanercept

La molécula de etanercept es un dímero de una proteína quimérica construida genéticamente por fusión del ligando extracelular del receptor p75 TNF-R a la porción Fc de la IgG1 humana. Etanercept actúa como un inhibidor competitivo del TNF- α . A diferencia del infiximab, etanercept puede también fijar TNF- β . La aparición de los agentes anti-TNF- α ha supuesto un paso fundamental para el tratamiento de pacientes afectados por enfermedades con sustrato inflamatorio hasta ahora difícilmente controlables (175). Etanercept está indicado en el tratamiento de la AR, artritis reumatoide poliarticular juvenil (ARJP), espondilitis anquilopoyética (EA), artritis

psoriásica (APs) y psoriasis (Ps) (176) (tabla 1.8). La dosis habitual es de 25 mg administrados mediante inyección subcutánea dos veces a la semana o 50 mg una sola vez de forma indefinida. Los efectos secundarios que en algún momento han planteado una especial preocupación han sido: infecciones incluyendo tuberculosis (TBC) y sepsis, tumores como linfomas, otros trastornos hematológicos incluyendo anemia y pancitopenia, enfermedades desmielinizantes, neuropatía, empeoramiento de insuficiencia cardíaca congestiva, aparición de autoanticuerpos/autoinmunidad y reacciones de hipersensibilidad.

En pacientes con EIOI se ha comenzado a evaluar la respuesta a etanercept, aunque todavía no se dispone de datos concluyentes, ya que se han obtenido resultados dispares (177-179). De forma anecdótica se ha empleado junto con metotrexato, con buenos resultados, permitiendo suspender los corticosteroides (180).

Tabla 1.8 Agentes biológicos. Posología e indicaciones aprobadas por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA)

Fármaco	Anti	Posología	Indicaciones	Aprobación EMA	Aprobación FDA
Etanercept	TNF- α	25 mg x2/s o 50 mg/s sc	AR, ARJP, APs, EA, Ps	2000	1998
Infliximab		3 mg/kg a las 0, 2 y 6 s seguido por 3,5, 7,5 mg/8s iv	AR, APs, EA, Ps, CU, EC	1999	1998
Adalimumab		40 mg/1-2s sc	AR, ARJP, APs, EA, Ps, EC	2003	2002
Anakinra	IL-1	100 mg/d sc	LNH, LLC, AR	2002	2001
Rituximab	CD 20	1g/s x2 iv	AR	1998	1997

AR: artritis reumatoide; ARJP: artritis reumatoide juvenil poliarticular; APs: artritis psoriásica; EA: espondilitis anquilopoyética; Ps: psoriasis; CU: colitis ulcerosa; EC: enfermedad de Crohn; LNH: linfoma no hodgkiniano; LLC: leucemia linfática crónica. (181-186)

1.15.3.2. Adalimumab

El adalimumab es un anticuerpo monoclonal recombinante formado por varias secuencias peptídicas humanas, que neutraliza las funciones biológicas del TNF- α uniéndose a los receptores de membrana celular de TNF. Se administra mediante inyección subcutánea de 40 mg cada dos semanas de forma indefinida. La dosis se puede aumentar a 40 mg semanales si disminuye la respuesta (187-189) (tabla 1.8). Se ha empleado con éxito en un paciente con hipoacusia neurosensorial autoinmune y artritis reumatoide (190).

1.15.3.3. Infliximab

El infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico constituido por la fracción constante de una inmunoglobulina IgG1 humana, y por la región variable, de origen murino, en la cual se encuentra la capacidad de fijación específica al TNF- α . El infliximab se une al TNF libre y a los receptores de membrana del TNF de las células diana, provocando con esta unión una lisis celular por activación del complemento o por citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

La pauta de administración habitual es mediante infusión intravenosa lenta (en 2 horas) de 3 mg/kg al comienzo del tratamiento, a las 2 y a las 6 semanas, seguido posteriormente por un tratamiento de mantenimiento cada 8 semanas de forma indefinida (191, 192) (tabla 1.8). La administración intratimpánica de infliximab puede ayudar a reducir las dosis de corticosteroides en pacientes con EIOI. Si bien estos resultados deben ser analizados con cautela, pueden ser relevantes para la puesta en marcha de estudios prospectivos (193).

1.15.4. Antagonistas de la IL-1

1.15.4.1. Anakinra

Anakinra es un análogo estructural no glicosilado del antagonista de los receptores de interleucina 1- α y 1- β (IL-1 RA). Es un polipéptido de 153 aminoácidos producido por técnicas de ADN recombinante en cultivos de *Escherichia coli*. Anakinra antagoniza los efectos de la IL-1. Está indicada en la AR, linfoma no hodgkiniano (LNH) y leucemia linfática crónica (LLC).

La dosis recomendada en adultos es de 100 mg cada 24 horas mediante inyección subcutánea (140, 194), (tabla 1.8).

Las reacciones adversas del anakinra son moderadamente frecuentes aunque no graves. Puede aparecer cefalea en más del 10% de los pacientes y es frecuente la aparición de reacciones en el lugar de inyección (eritema, equimosis, inflamación y dolor). En ocasiones (2,4%) puede aparecer neutropenia leve, que no suele dar lugar a infecciones graves.

1.15.5. Antagonistas del receptor CD20 de los linfocitos B

1.15.5.1. Rituximab

Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano, obtenido por ingeniería genética, formado por una inmunoglobulina glucosilada con las regiones constantes de la IgG1 humana y las secuencias de la región variable de las cadenas ligeras y cadenas pesadas murinas. Se produce a partir de un cultivo en suspensión de células de ovario de hámster chino, y se purifica mediante cromatografía de afinidad y de intercambio iónico, incluyendo procedimientos de inactivación y eliminación viral.

Rituximab se une a través de su dominio Fab al receptor CD20, una fosfoproteína transmembrana no glucosilada, de los linfocitos pre-B y B maduros. A través de su dominio Fc puede reclutar efectores de la respuesta inmune para mediar la lisis de las células B. También se ha demostrado que la unión del rituximab al antígeno CD20 induce la muerte celular por apoptosis (195).

Rituximab está indicado en el tratamiento de la AR. La dosis recomendada en el tratamiento de la AR es de 1000 mg en perfusión intravenosa, seguida, dos semanas más tarde, de una segunda perfusión intravenosa de 1000 mg (tabla 1.8).

Las reacciones adversas más frecuentes y que se consideran atribuibles a la administración de rituximab son reacciones a la perfusión (hipotensión, náuseas, erupción, fiebre, prurito, urticaria, irritación de garganta, taquicardia, edema periférico). También pueden aparecer infecciones del tracto respiratorio superior y del tracto urinario (196).

Varios estudios recientes han ensayado rituximab en pacientes con EIOI y han obtenido una tasa alta de respuesta (197, 198).

En la tabla 1.8 se muestran las enfermedades en las cuales está aprobado el uso de estas terapias, aunque sus indicaciones son mucho más amplias (199).

En la figura 1.7 se indican los mecanismos de acción de los agentes biológicos estudiados mediante lo cual bloquean diferentes componentes de la cascada inflamatoria que conduce a la lesión del oído interno.

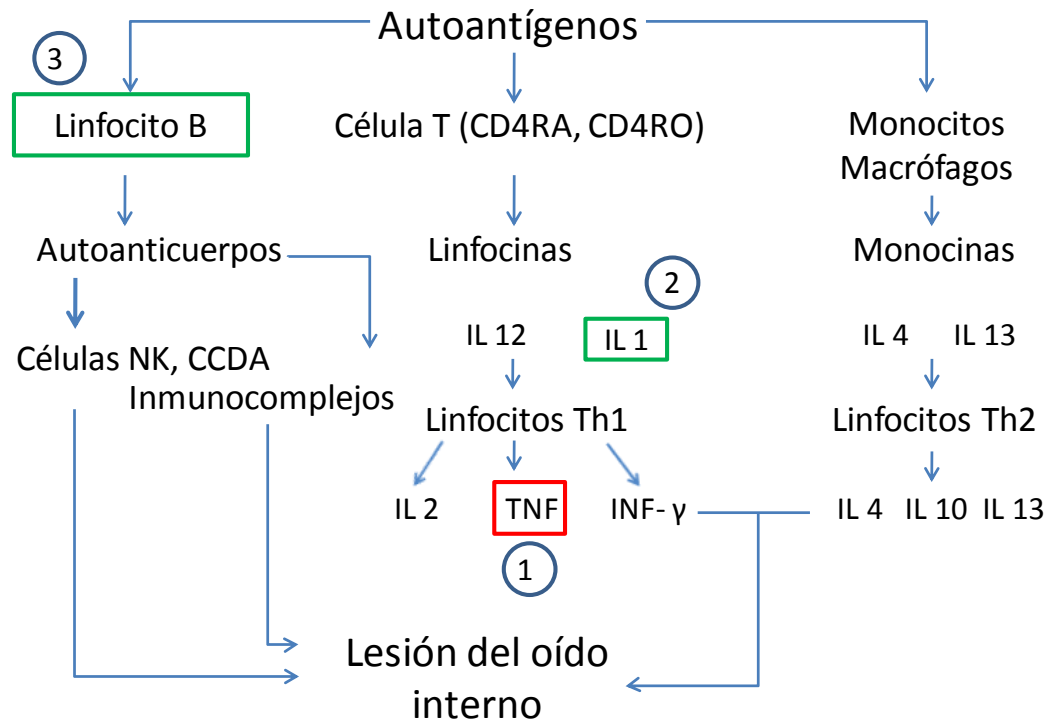


Figura 1.7 Mecanismo de acción de los agentes biológicos. Se indica con un número dentro de un círculo los lugares donde actúan los diferentes fármacos: 1: inhibidores del TNF- α ; 2: antagonistas de la IL-1; 3: antagonistas del receptor CD20 de los linfocitos B. TNF: factor de necrosis tumoral; IL: interleucina; INF: interferon; CCDA: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Dado que los bloqueantes del TNF- α se han mostrado eficaces en el tratamiento de determinadas enfermedades autoinmunes sistémicas (artritis reumatoide, psoriasis, etc), esta terapia biológica podría ser útil en el control de la EIOI, gracias a su efecto inmunomodulador.

2.2. OBJETIVOS

1. Estudio de la eficacia del etanercept, un inhibidor del TNF- α , para prevenir o restablecer los cambios morfológicos y funcionales de la cóclea, objetivados mediante microscopia electrónica de barrido y potenciales evocados auditivos de tronco cerebral, en un modelo de laberintitis experimental en el cobaya y de este modo obtener una evidencia experimental de su posible utilidad en el tratamiento de la EIOI.

2. Comparación de los resultados morfofuncionales obtenidos en los animales tratados con etanercept, con un grupo de animales tratados con glucocorticoides (GC), fármacos clásicamente utilizados en las enfermedades autoinmunes. Esto ayudará a diseñar nuevos protocolos terapéuticos donde se optimice la participación de los diversos fármacos.

3. Evaluación de los resultados de los ensayos clínicos con inhibidores del TNF- α en pacientes con EIOI primaria o hipoacusia neurosensorial secundaria a otras enfermedades autoinmunes realizados hasta este momento.

III MATERIAL Y MÉTODOS

III MATERIAL Y MÉTODOS

A) ESTUDIO EXPERIMENTAL

3.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

El animal utilizado en este estudio fue el cobaya. Los cobayas fueron suministrados por Charles River España y se alojaron en el animalario del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Puerta de Hierro.

Se utilizaron cobayas hembras sanas, albinas, de la cepa Dunkin-Hartley, con un peso inicial de 300 a 700 gramos. A todos los animales se les realizó otoscopia al comienzo del estudio, con el objetivo de comprobar la ausencia de cualquier alteración en el conducto auditivo externo o en el oído medio que supondría la exclusión del estudio. Cuatro cobayas fueron excluidos del estudio: dos al no poder finalizar el mismo (una muerte intraoperatoria y otra muerte durante la realización de los PEATC), y dos al presentar una otitis seropurulenta.

Los animales se alojaron en una cubeta de suelo sólido y con material de lecho (serrín), de unos 25 cm de altura, con tapa y se mantuvieron a una temperatura estable entre 18 y 22°C, y no superior a 28°C, con una humedad relativa entre el 45 y el 70% y ciclos diarios de 12 a 16 horas de luz. Se les proporcionó alimentos para cobayas, enriquecidos en vitamina C, de forma regular, y se añadió heno de buena calidad a la dieta, como aporte de fibra cruda.

Todos los procedimientos experimentales, así como el cuidado de los animales y su sacrificio, fueron realizados siguiendo las recomendaciones éticas actuales recogidas en la literatura internacional (200-205) y de acuerdo con las normas sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos recogidos en el RD

1201/2005 (BOE número 252, 21 de octubre de 2005), en la directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y el Consejo de 22 de julio de 2003, y la ley 32/2007 del 8 de noviembre de 2007 para el cuidado de animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

3.2. INSTRUMENTAL

3.2.1. Instrumental quirúrgico

En el abordaje y en la disección se empleó un instrumental otoquirúrgico básico adaptado a pequeños animales, formado por instrumental microquirúrgico y de fresado.

Instrumental microquirúrgico: Es el convencional de microcirugía neurootológica del cual se seleccionaron las siguientes piezas: microgancho angulado, microgancho angulado con punta en ángulo de 90° y pinzas de cuerpos extraños Hartmann-Wullstein.

Instrumental de fresado: Consta de un motor eléctrico (motor BIEN-AIR ME-40), transmisión flexible y pieza de mano angulada. Acopladas a la pieza de mano van las fresas de acero de seis dientes y las de diamante de 0,7 y 1,4 mm.

También se utilizó instrumental convencional y un sistema de aspiración y lavado mediante irrigación.

3.2.2. Equipo de anestesia

El equipo de anestesia utilizado fue el Draeger SA-2. La temperatura del animal se monitorizó vía rectal con un monitor Vitara PM 8060 (Draeger) y también se monitorizó la frecuencia cardíaca mediante un electrocardiograma.

3.2.3. Equipo de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC)

Se utilizó el equipo Synergy Mobile (Oxford Instruments).

3.2.4. Microscopio quirúrgico

Para visualizar correctamente las estructuras se utilizó un microscopio de cirugía otológica Zeiss Opmi 2, trabajando a 8x.

3.2.5. Microscopio óptico

Se empleó un microscopio óptico Carl Zeiss modelo Axiolab drb KT.

3.2.6. Microscopio electrónico de barrido (MEB)

Este estudio se realizó en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Se empleó un microscopio electrónico de barrido modelo Phillips XL-30 y en algunas ocasiones un MEB modelo Hitachi S-3000N.

3.3. ANESTESIA

3.3.1. Anestesia intraoperatoria

Los procedimientos quirúrgicos fueron realizados bajo anestesia general inhalatoria en el quirófano del Servicio de Cirugía Experimental de la Clínica Puerta de Hierro, empleando Isoflorano (Forane®.Abbot), con monitorización cardiaca.

Se realizó una inducción anestésica inhalatoria con isoflurano al 5% con mascarilla y flujo de O₂ a 5 litros por minuto (lpm). El mantenimiento anestésico se logró con isoflurano al 1,5% en mascarilla y O₂ a 2 lpm. La analgesia intraoperatoria se

obtuvo con clorhidrato de morfina 2 mg/kg subcutáneo (s.c.), y meloxicam 0,2 mcg/kg s.c.

3.3.2. Sedación para la realización de PEATC

Previamente a la realización de los PEATC, los animales fueron inmovilizados y sedados mediante la administración de diazepam 5-10 mg/kg intraperitoneal (i.p.), atropina 0,2 mg/kg i.m. y ketamina 30-40 mg/kg i.p.

3.3.3. Anestesia presacrificio

Para proceder al sacrificio del cobaya es preciso sedar primero al animal, por tanto se procedió como se explica en el punto 3.3.2. A veces hubo que utilizar una dosis mayor de ketamina (1,5 o 2x) para lograr una anestesia profunda.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el objeto de estudiar la respuesta al tratamiento con etanercept en un modelo animal de laberintitis experimental por KLH (86), se utilizaron 4 grupos de cobayas (grupos 1 al 4) que fueron sacrificados a las 4 semanas de comenzar el protocolo de inmunización. En todos los animales se realizó un estudio funcional auditivo e histopatológico.

3.4.1. Protocolo de inmunización

Treinta cobayas fueron inmunizados subcutáneamente con 1 mg de KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*. Sigma-Aldrich ®) en 100 microlitros de adyuvante completo de Freund (CFA, Sigma-Aldrich ®) y con 1 mg de KLH en 100 microlitros de adyuvante incompleto de Freund (IFA, Sigma-Aldrich ®) a las dos semanas. Una

semana más tarde, se realizó bajo anestesia general inhalatoria (isoflurano) un microorificio en la escala timpánica de la espira basal de la cóclea y se perfundieron 25 microlitros de KLH en el compartimento perilinfático.

3.4.2. Grupos

Grupo 0: Grupo piloto

Cinco animales fueron inmunizados con KLH según el protocolo de inmunización y tras su sacrificio se estudiaron las cócleas mediante microscopia óptica con el fin de validar el diseño experimental, comparando los hallazgos con aquellos descritos en la literatura y en un modelo de laberintitis experimental previo (86).

Grupo 1: Administración de 6-metilprednisolona (MP)

Diez animales recibieron tratamiento con 1 mg/kg de peso de 6-metilprednisolona intraperitoneal, 30 minutos antes de la perfusión intracoclear de KLH y tres días después de la misma (ver apartado 3.5.2.5.).

Grupo 2: Administración de bloqueante de TNF- α (etanercept). (E)

Diez animales fueron sometidos a tratamiento con 2,5 mg de etanercept intraperitoneal, 30 minutos antes de la perfusión intracoclear de KLH y tres días después de la misma.

Grupo 3: Grupo control KLH (CKLH)

Cinco animales no recibieron tratamiento. Este grupo nos permitió valorar los efectos de una laberintitis experimental autoinmune por KLH en ausencia de tratamiento (corticoide o anti-TNF- α).

Grupo 4: Grupo control PBS (C)

Cinco animales no fueron inmunizados con KLH (según el protocolo de inmunización). Estos cobayas recibieron una inyección subcutánea de 0,2 ml de CFA en 0,2 ml de solución amortiguadora con fosfato (PBS, abreviatura inglesa de *phosphate buffered saline*) y dos semanas después 0,2 ml de IFA en 0,2 ml de PBS. Una semana más tarde se perfundieron 25 microlitros de PBS en el interior de la cóclea a través de un orificio en la escala timpánica de la espira basal (ver apartado 3.5.2.5.).

Este grupo nos permitió conocer los efectos de la propia intervención quirúrgica sobre la cóclea y la audición en ausencia de una respuesta autoinmune inducida local.

El estudio de la función auditiva se realizó en todos los cobayas de los grupos 1, 2, 3 y 4 mediante potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC) antes de iniciar el experimento y una semana después de la inmunización coclear, antes de proceder a su sacrificio (apartado 3.6.3) (tabla 3.1).

Tras el sacrificio, las cócleas de todos los animales de los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron procesadas para su estudio con MEB (apartados 3.8.2.2 y 3.10).

Tabla 3.1 Diseño experimental

	nº	Semana 0 →	semana 2 →	T	semana 3 →	T	semana 4
Grupo 1: MP	10	Inmunización KLH-CFA	1 PEATC	Inmunización KLH-IFA	Inmunización intracoclear KLH	2 PEATC	Sacrificio
Grupo 2: E	10						
Grupo 3: C KLH	5						
Grupo 4: Control	5	Inmunización PBS-CFA		Inmunización PBS-IFA	PBS intracoclear		

MP: grupo 6-metilprednisolona; E: grupo etanercept; CKLH: grupo control KLH; CFA: adyuvante completo de Freund; IFA: adyuvante incompleto de Freund; PEATC: potenciales evocados auditivos de tronco cerebral; T (relleno en azul): tratamiento con 6-metilprednisolona o etanercept 30 minutos antes y 3 días después de la inmunización coclear.

3.5. INMUNIZACIÓN DEL COBAYA

3.5.1. Inmunización primaria

El cobaya puede ser sensibilizado con facilidad, lo cual se consigue por medio de inyecciones repetidas que dan lugar a una reacción de hipersensibilidad. Se utilizó KLH en adyuvante de Freund.

3.5.1.1. *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH)

El KLH es un inmunoestimulante y transportador de haptenos derivado de una glicoproteína circulante del molusco marino *Megathura crenulata*, que habita cerca de la costa de California desde la bahía de Monterrey hasta la isla de Asunción.

3.5.1.2. Adyuvantes de Freund

El adyuvante incompleto de Freund consiste en una solución acuosa con el antígeno, junto con un aceite mineral y un agente dispersante (el manoleato). El adyuvante completo de Freund es como el incompleto, pero incorpora una suspensión de *Mycobacterium* muertos por calor.

Ambas versiones liberan lentamente el antígeno (Ag), con lo que se logra un estímulo persistente. El mecanismo mediante el cual actúan es el siguiente: los macrófagos al contactar con el antígeno aumentan en su superficie el número de moléculas B7, lo que facilita su interacción con el receptor CD28 del linfocito T Helper (Th). Esto suministra la señal coestimuladora, que potencia la interacción entre el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) del macrófago, el Ag procesado y el receptor de linfocitos T (RCT).

El adyuvante completo es más potente porque suministra muramil dipéptidos de la pared celular de las micobacterias: ello permite una buena activación de los macrófagos, que liberan la citocina IL-1, que a su vez activa a los linfocitos Th.

El adyuvante completo también induce mejor los granulomas. El granuloma se produce por una infiltración celular, con una masa densa y rica en macrófagos, con lo que mejora el procesamiento y presentación del Ag. Sin embargo, no debe utilizarse el adyuvante completo dos veces porque el animal podría morir de shock anafiláctico. Son potentes sustancias antigénicas que desencadenan una fuerte respuesta inmunitaria.

La primera inyección se hizo coincidir con los primeros PEATC. De esta forma se inmunizó al animal al terminar la prueba, cuando todavía estaba anestesiado.

La segunda inmunización se realizó a las dos semanas y no coincidía con ninguna otra prueba, por lo que se realizó con el animal despierto.

3.5.1.3. Lugar de punción

Tras probar varios sitios de punción (en estudio piloto con dos animales), se consideró la nuca el más adecuado (figura 3.1). Se consigue pellizcando la piel del cuello e inoculando el antígeno mediante una aguja de insulina (calibrada de 0 a 10 U de

Insulina o lo que es equivalente, de 0 a 1 ml), lo cual resulta sencillo porque en esta región el tejido subcutáneo es muy grueso.

La jeringuilla se cargó con 0,14 ml de adyuvante completo o incompleto de Freund y 0,1 ml de KLH. La absorción de la sustancia es lenta.



Figura 3.1 Inmunización subcutánea.

Ocasionalmente se organizó una reacción inflamatoria local en el lugar de la punción.

3.5.2. Inmunización secundaria. Técnica quirúrgica

3.5.2.1. Anestesia

Se procedió según se explica en el apartado 3.3.1.

3.5.2.2. Preparación quirúrgica

El animal se colocó en decúbito ventral sobre la mesa de quirófano, que está cubierta por una manta de calor (Sistema Bair Hugger modelo 505), con el eje mayor del cuerpo orientado en posición longitudinal. Se rasuró bien la zona a operar así como la región de contacto con la placa del electrobisturí (la pared abdominal) (figuras 3.2 A y B).

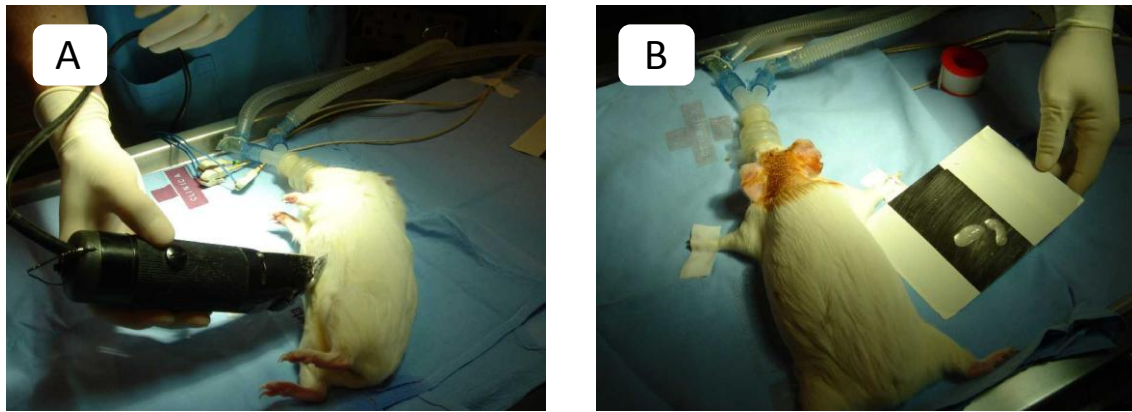


Figura 3.2 Preparación quirúrgica. A: Rasurado de la pared abdominal (región de contacto con la placa del electrobisturí). **B:** Colocación del cobaya en decúbito ventral. Se ha limpiado el campo quirúrgico con Betadine ®.

En el abordaje y en la disección se empleó instrumental otoquirúrgico básico adaptado a pequeños animales, instrumental convencional y un sistema de aspiración y lavado mediante irrigación (ver apartado 3.2.1.)

Para visualizar correctamente las estructuras se utilizó un microscopio de cirugía otológica Zeiss Opmi 2, trabajando a 8x.

3.5.2.3. Anatomía quirúrgica

El hueso temporal constituye la mitad inferior del cráneo del cobaya, posterior al hueso escamoso. La bulla timpánica es una gran cavidad con las paredes anterior e inferior redondas y lisas. La pared lateral de la bulla está formada por la membrana timpánica y la apófisis mastoides, que es una prolongación de la bulla, y no contiene celdillas aéreas. La pared medial contiene la mayoría de las estructuras del oído medio. La cóclea es la estructura más sobresaliente de la pared medial, proyectando su eje mayor dentro de la bulla en una dirección anterior y ligeramente inferior (86).

3.5.2.4. Abordaje quirúrgico del oído medio del cobaya

El procedimiento se realizó en condiciones estériles, para lo cual se limpió bien la zona con alcohol, se pintó el campo quirúrgico con Betadine® y se colocó un paño estéril. Se infiltró la zona con lidocaína o bupivacaína, a las que se añadía epinefrina o norepinefrina para conseguir una vasoconstricción local y ralentizar la absorción del compuesto.

Se eligió un abordaje retroauricular puesto que el acceso a la cóclea es más rápido, y tiene menos morbilidad, ya que no se cruzan estructuras vasculares (vena yugular anterior) ni nerviosas importantes (nervio recurrente, nervio facial), y se escogieron aleatoriamente los oídos derechos para realizar la intervención quirúrgica.

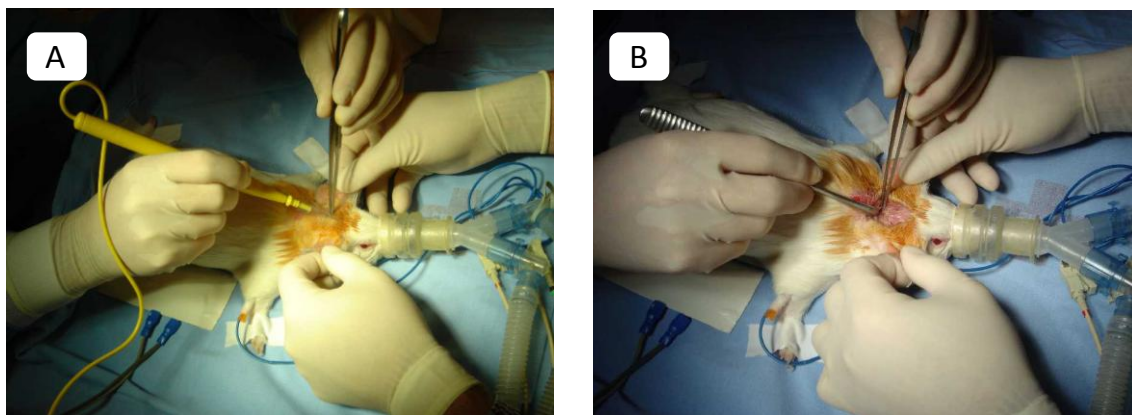


Figura 3.3 Abordaje quirúrgico retroauricular A: Incisión mediante electrobisturí en la línea media de la cabeza desde el vértex hacia la línea nuchal. **B:** Separación de los músculos y el tejido celular subcutáneo y desperiostización del hueso de la bulla timpánica.

A continuación se describe la técnica quirúrgica:

Mediante electrobisturí se realiza una incisión en la línea media de la cabeza desde el vértex hacia la línea nuchal prolongándola ligeramente hacia la derecha por detrás de la oreja (figura 3.3 A). Se separan los músculos y el tejido celular subcutáneo

mediante un separador otológico autoestático y se hace hemostasia cuidadosamente (figura 3.3 B).

A continuación se desperiostiza el hueso de la bulla timpánica alrededor del meato óseo externo, y se inicia un fresado óseo por encima de la pared posterosuperior del conducto auditivo externo o aticotomía con una fresa otoquirúrgica hasta identificar el complejo incudo-maleolar y la inserción de la membrana timpánica en el marco óseo del hueso timpanal (figura 3.4); así mismo se respeta el nervio facial a su salida por el orificio estilomastoideo, antes de introducirse en la glándula parótida, ya que su lesión podría empeorar la masticación y consiguientemente la nutrición y el bienestar del animal.

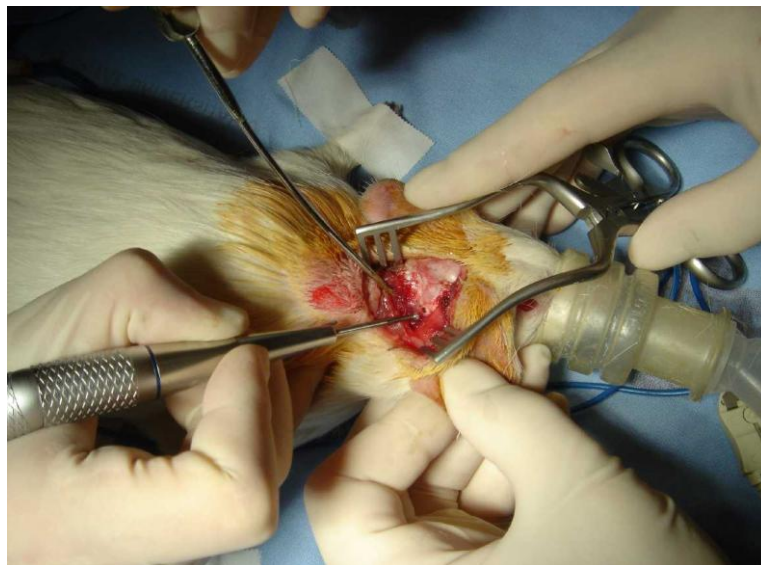
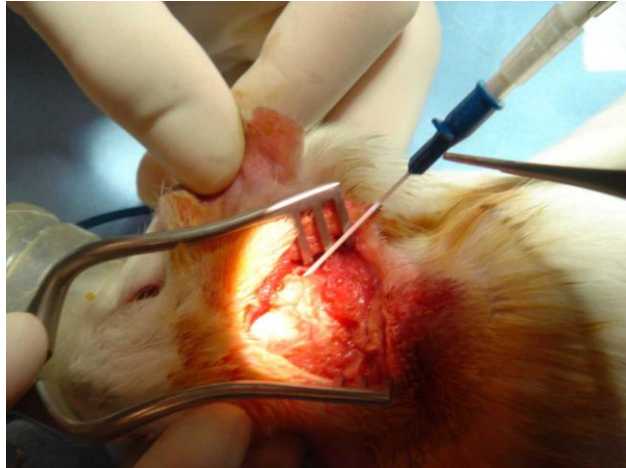


Figura 3.4 Fresado óseo por encima de la pared posterosuperior del conducto auditivo externo con una fresa otoquirúrgica.

En este estudio se respetó la membrana timpánica ya que era preciso mantener indemnes las estructuras del oído medio y externo del cobaya.

3.5.2.5. Inmunización intracoclear

Se realizó un microorificio con la fresa quirúrgica de 1 mm, en la rampa timpánica de la espira basal coclear; se extrajeron 25 microlitros de perilinfa y se perfundieron lentamente 1000 microgramos de



KLH disueltos en PBS mediante una micropipeta de 100 microlitros. Para lograr esto, un método sencillo y práctico fue adaptar el terminal alargado y flexible que protege los Abocaths más finos (del 20 ó 22) en la micropipeta de 100 microlitros (figura 3.5).

A continuación se selló el orificio con cera de hueso. Se cerró el defecto óseo de la bulla con cera de hueso y restos óseos de la misma obtenidos tras el fresado, o con músculo autólogo de la nuca, libre o pediculado, y se suturó la herida por planos (figura 3.6).

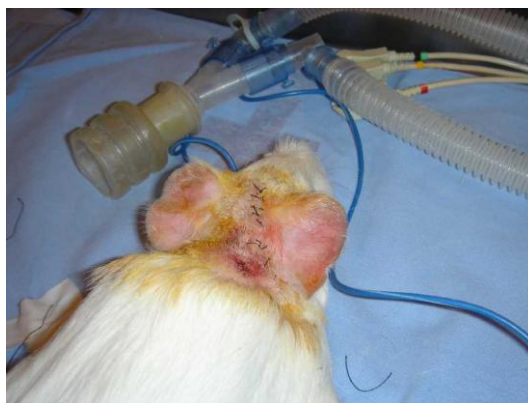


Figura 3.6 Sutura de la herida.

3.5.2.6. Cuidado postoperatorio

Se aplicó Betadine® a la herida y se colocó al cobaya en una manta con una fuente de aire caliente mientras se recuperaba de la anestesia (figura 3.7). Este momento es muy delicado y es recomendable vigilar al animal.

Para mantener una analgesia adecuada en el postoperatorio se administró morfina 2mg/kg cada 4 h durante 24 h, efecto que se vio potenciado por el uso concomitante de un antiinflamatorio no esteroideo (meloxicam), que se administra en una sola dosis ya que su efecto dura 24 h.

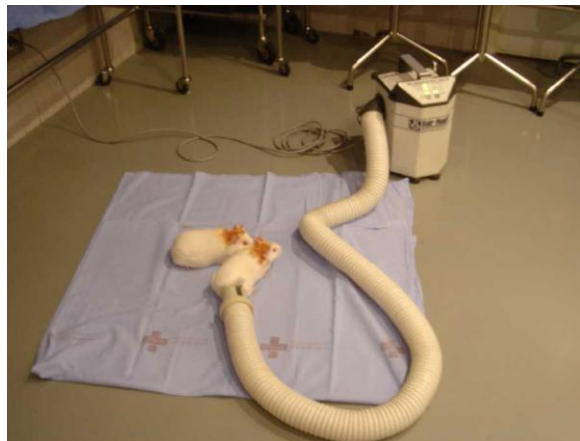


Figura 3.7 Cuidados postoperatorios. Colocación de los cobayas en una manta próximos a una fuente de aire caliente.

3.6. EXPLORACIÓN DE LA AUDICIÓN

3.6.1. Reflejo de Preyer

Primero se exploró el reflejo de Preyer o movimiento de los pabellones auditivos al palmear, que debe ser positivo.

3.6.2. Otoscopia

Con el animal sedado, como se explica en el apartado 3.3.2., se realizó una otoscopia con un otoscopio utilizado habitualmente en la clínica y un espéculo fino,

registrando los posibles cambios o patología en oído externo y/o medio. Se retiró la cera del conducto auditivo externo con un ganchito fino abotonado siempre que ésta impidiera visualizar correctamente el tímpano. Todas estas maniobras resultaron más sencillas si el animal estaba correctamente sedado.

3.6.3. Estudio electrofisiológico

3.6.3.1. Sedación del cobaya

Para estudiar la función auditiva mediante PEATC es necesario sedar al cobaya, lo cual se realizó como se explica en el apartado 3.3.2.

3.6.3.2. Protocolo de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC)

Los PEATC registran los potenciales que se generan en la vía auditiva desde el nervio acústico hasta el colículo inferior tras un estímulo auditivo. Se generan siete ondas sucesivas aunque se describen en general cinco ondas (la I se origina posiblemente en el órgano de Corti y refleja la despolarización del nervio auditivo, la II en el nervio auditivo, antes de su entrada en el tronco del encéfalo, a nivel del núcleo del VIII par craneal, la III en los núcleos del tronco del encéfalo, a nivel de la protuberancia, la IV refleja la conducción troncoencefálica a nivel del lemnisco lateral y la V se genera en el colículo inferior). El componente más fácil de identificar de los potenciales de tronco es la onda V, es la más resistente al bajar la intensidad del estímulo acústico, siendo más difícil de identificar los otros componentes al realizar esta maniobra. Los PEATC son resistentes a la mayoría de los fármacos, no obteniéndose cambios significativos después del uso de barbitúricos. Tampoco existen alteraciones significativas entre el sueño y la vigilia. En cambio, pueden ser alterados por el ruido de fondo y movimientos musculares.

La actividad bioeléctrica se recogió con electrodos de aguja, se amplificó y se filtró con filtros de pasa-banda desde 30 a 10.000 Hz en alta frecuencia y de 0,01 a 300 Hz en baja frecuencia con un equipo Synergy Mobile (Oxford Instruments). Se utilizaron 3 electrodos: uno para recoger la señal, otro contralateral al oído explorado y el último de tierra. Se colocaron intradérmicamente debajo de la oreja sobre el hueso temporal y en la cabeza en línea media (figura 3.8). Habitualmente este último electrodo fue el que hizo de tierra. Es importante que las agujas de los electrodos estén suficientemente afiladas para atravesar la dura piel del cobaya. De otro modo se pueden doblar y producir más interferencias. Se prefieren, por tanto, puntas desechables a puntas integradas, aunque estas últimas suelen recoger mejor la señal y generar registros de mayor calidad. En este estudio se utilizaron puntas integradas. Una maniobra que facilitó la colocación de los electrodos consistió en pellizcar la piel de los carrillos e insertar las puntas de delante a atrás manteniendo una suave rotación de la aguja para facilitar su penetración. En casos de gran resistencia de la piel es aconsejable rasurar las regiones donde se deben situar los electrodos.

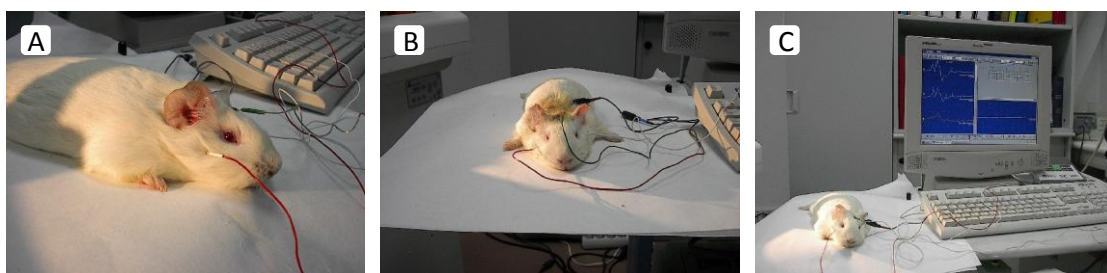


Figura 3.8 Estudio electrofisiológico. A: Colocación del auricular dentro del conducto auditivo externo del cobaya **B:** Disposición de los electrodos de aguja que recogen la señal bioeléctrica. **C:** Obtención de los umbrales auditivos del cobaya mediante el equipo de PEATC Synergy Mobile.

Los PEATC se obtuvieron con 2000 estímulos pulsados tipo "click" de rarefacción. Cada PEATC se obtuvo con una ventana de 10 ms a una frecuencia de 8 kHz. Los clicks fueron presentados a una intensidad inicial de 95 dB SPL (*sound pressure level*), decreciendo de 10 en 10 dB o de 5 en 5 dB la intensidad de los siguientes estímulos hasta alcanzar el umbral en el que no se registraban respuestas eléctricas. La latencia se midió para todas las ondas desde la presentación del estímulo hasta los picos positivos. El umbral auditivo se definió como la menor intensidad del estímulo con la que se obtenía una onda V reconocible.

3.7. EXPLORACIÓN VESTIBULAR

Se observó la conducta del animal tras la realización de la inmunización coclear para detectar alguna alteración que sugiriera la presencia de una lesión vestibular, como es la deambulación en círculos sobre una superficie horizontal, siempre en el mismo sentido de giro, mostrando una gran inestabilidad y una oscilación de la cabeza.

3.8. PROCESAMIENTO HISTOPATOLÓGICO

3.8.1. Sacrificio. Fijación intravital

Se realizó una fijación intravital con el objeto de reducir el tiempo de autólisis y mejorar el procesamiento de las cócleas.

Para realizar este procedimiento es preciso sedar primero al animal, como se explica en el punto 3.3.3. A veces hubo que utilizar una dosis mayor de ketamina (1,5 o 2x) para lograr una anestesia profunda.

El animal correctamente anestesiado se situó en decúbito dorsal. A continuación se realizó una toracotomía cuadrangular, pediculada superiormente, levantando en forma de peto toda la pared anterior del tórax, y evitando profundizar para no lesionar

las estructuras cardiovasculares. Se inyectó heparina (0,1 ml) en el ventrículo izquierdo, se clampó la aorta descendente abdominal, se abrió la aurícula derecha y, mediante un sistema en “Y”, se pasó una solución salina caliente (500 ml) para lavar los órganos durante 5 minutos vía ventrículo izquierdo-aorta (figura 3.9). Posteriormente se pasó la solución fijadora: paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,2 M + glutaraldehído al 25% (350 ml), de forma rápida durante los primeros 5 minutos, y lentamente durante 20 a 25 minutos (Tabla 3.2).



Figura 3.9 Fijación intravital.

Tabla 3.2 Preparación de la solución amortiguadora de paraformaldehído al 4%
(para utilizar en el proceso de fijación intravital)

FIJADORES: Para obtener un tampón fijador o solución amortiguadora de paraformaldehído al 4% (fijación intravital) se siguió este protocolo. Para 1 litro:

500 ml de agua destilada

40 g de paraformaldehído (Sigma P-6148/ polvo / tóxico)

500 ml de tampón fosfato 0,2 M pH= 7.4

NaOH 1 N

Esta solución amortiguadora o tampón debe ser preparada en campana extractora, utilizando guantes y mascarillas (es muy importante ya que se manejan productos tóxicos).

- Se calienta el agua en un vaso de precipitado de 1L de capacidad, en un agitador magnético con calor. La temperatura que necesitamos es de 40°C-60°C (tapar el vaso de precipitado con papel de plata, cuando se esté calentando el agua, ya que se evaporaría y tardaría más tiempo en calentarse).

- Seguidamente añadir los 40g de paraformaldehído agitando el agua (utilizar un agitador magnético). Echar todo de golpe y esperar a que se disuelva, si no se disuelve bien repetir el proceso comprobando muy bien la temperatura, ya que en ocasiones, si se deja el vaso de precipitado en la misma placa calefactora, ésta guarda temperatura y el agua sufrirá un aumento de la misma desde el momento en que se midió y puede provocar que precipite.

- Si está bien disuelto, añadir poco a poco la sosa 1 N hasta que la disolución se vuelva transparente (hay que tener cuidado de no excederse con la sosa, ya que el pH puede sobrepasar $7,4 \pm 0,1$, si esto sucede se deberán añadir unas gotas de ácido clorhídrico 1 N).

- Añadir 500 ml de tampón fosfato 0,2 M y esperar a que la disolución se enfríe para poder medir el pH (mayor temperatura, menor pH y a la inversa).

- Medir el pH, teniendo preparada la sosa 1 N por si hiciera falta añadir un poco para alcanzar el pH 7,4. Si tenemos que añadir unas gotas a la disolución, debe estar agitándose, para que la sosa se distribuya bien por todo el volumen, y con el electrodo del pH metro midiendo (estas últimas gotas se deben echar muy despacio esperando que el pH suba poco a poco para no excedernos).

- Si la disolución presentara un "pequeño" precipitado, filtrar con papel de filtro estándar.

- Guardar en un frasco hermético y bien etiquetado (fecha, nombre y pH).
- Prepararlo siempre el día que se vaya a usar, aunque se puede preparar el día anterior sin que pierda ninguna de sus propiedades, pudiendo así agilizar el trabajo

3.8.2. Obtención y procesamiento de las muestras

Inmediatamente después de la perfusión se procedió a la decapitación del animal con una guillotina. Se realizó una incisión longitudinal en la piel desde la región nasal hasta el occipital. Se separaron los músculos insertados en el cráneo, y éste se desperiostizó hasta alcanzar ambos conductos auditivos externos. Se abrió con cizalla el hueso occipital por su línea media, y desde aquí se eliminaron ambos parietales. Se extrajo el contenido endocraneal y se visualizaron ambos peñascos por vía suboccipital. Para extraer el temporal es necesario seccionar la base del cráneo entre ambas bullas con cizalla o tijera fuerte, pero de forma controlada para evitar líneas de fractura que puedan afectar a ambos temporales. Esta maniobra se complica en los sujetos adultos por existir una osificación plena de las suturas y un engrosamiento óseo generalizado. Una vez individualizadas las bullas timpánicas se limpiaron de restos musculares, contenido encefálico, periostio y grasa. La apertura de la bula se realizó con punzón o gubia, y siempre evitando la pared medial, ya que en ella se implanta la cóclea, con su eje mayor orientado anteroinferiormente.

Las cócleas se perforaron a nivel del ápex y de la espira basal o bien se perfundieron con formol (para estudio con microscopia óptica) o glutaraldehído (para estudio con MEB) lentamente a través de las ventanas redonda y oval, una vez extraído el estribo, para evitar desgarros de las estructuras membranosas por presión excesiva, y posteriormente se introdujeron en un recipiente con el mismo fijador durante toda la noche (Tabla 3.3). El objetivo de esta fase es preservar el tejido haciéndolo resistente a ulteriores cambios autolíticos o por reacción con los agentes utilizados en su procesamiento.

La postfijación de órganos se realizó con formol al 10% para el estudio con microscopio óptico y con glutaraldehído al 25% para el estudio con microscopia electrónica de barrido.

3.8.2.1. Procesamiento de las cócleas para microscopia óptica

Cuando las cócleas se iban a observar mediante microscopio óptico se procedió conforme al siguiente protocolo:

Se introducen las cócleas en ácido etilendiaminotetracético (EDTA, abreviatura inglesa de *ethylenediaminetetraacetic acid*) al 10% durante 7-14 días, realizando cambios diarios para mantener el pH entre 5,5 y 6,5, hasta conseguir una descalcificación adecuada. El objetivo de esta fase es la extracción de las sales de calcio presentes en los huesos y hacer posible el corte de la pieza.

A continuación se elimina el EDTA que queda en solución para evitar su reacción con el alcohol que se va a utilizar en la siguiente fase. Para esto se utiliza un tampón fosfato 0,1 M a pH 7.4.

Las cócleas se tallan seccionándolas por el modiolos y se realiza el proceso de inclusión en parafina, que tiene como objeto incluir el material de estudio en un bloque sólido que una vez endurecido pueda ser cortado en secciones.

La primera fase consiste en la deshidratación de los tejidos, que se logra al pasar la pieza sucesivamente por alcohol de graduación creciente (hasta llegar a una concentración de alcohol etílico al 100%), xilol y parafina (Merck ®, a 56-58°C). El bloque de parafina se hace en una estación semiautomática de trabajo (Oxford Trade).

Se realizan cortes de 5-7 micras de espesor con un microtomo LEITZ 1512, y se colocan en portaobjetos pretratados con albúmina como adhesivo. Se realiza una tinción

con hematoxilina-eosina, previa desparafinización con Histolemon ®, y rehidratación con alcoholes de graduación decreciente hasta emplear agua corriente.

3.8.2.2. Procesamiento de las cócleas para microscopia electrónica de barrido (MEB)

Cuando las cócleas se iban a procesar para microscopio electrónico de barrido, fue necesario abrir ampliamente el hueso para descubrir el órgano de Corti. Bajo ampliación con la lupa quirúrgica, se extrajo la pared ósea de la cóclea con una aguja de insulina. La punta de la aguja debe penetrar en la cápsula pero no introducirse en los espacios subyacentes, para evitar dañar el laberinto membranoso. A partir del orificio creado, se fue fracturando el hueso mediante movimientos dirigidos de dentro hacia fuera hasta exponer el contenido de la rampa timpánica, media y vestibular, que quedan ocultas por la cara externa del ligamento espiral. A continuación con unas pinzas de relojero se extrajo el ligamento espiral junto con la estría vascular adherida a su cara interna y, se guardó en un tubo de eppendorf con glutaraldehído, para una investigación paralela (206). Las cócleas se guardaron en glutaraldehído al 3% en buffer cacodilato sódico 0,1 M bien identificadas.

A las 24-48 horas se procedió a la deshidratación de las muestras sumergiéndolas en alcoholes de creciente graduación. Primero en alcohol de 20°, después 40°, 60°, 80° y finalmente en tres frascos en alcohol de 100°. Se sumergieron las muestras unos 15-20 minutos en cada recipiente.

A continuación se realizó el punto crítico (sistema Emitec 850). El secado de punto crítico es un método para secar tejidos sin que éstos se colapsen o se deforme su estructura original. Al secar un tejido con aire o al vacío se generan daños en las superficies que se van a observar mediante MEB. Esto se debe a las fuerzas de tensión que se crean en cavidades de pequeñas dimensiones donde hay una interfase

líquido/gas. En el caso de muestras delicadas esto puede provocar que la estructura se colapse completamente. Se utilizó el CO₂ líquido como medio de secado. Es el más utilizado porque no es caro y es ecológicamente aceptado en comparación con el Freon 113.

Posteriormente se montaron las piezas en soportes adecuados, y el tejido pudo entonces metalizarse antes de ser colocado en el microscopio electrónico de barrido (Phillips XL-30 o Hitachi S-3000N) para su observación y análisis de imagen. El metal empleado fue oro y esto se hizo mediante un recubridor BIORAD modelo SC 502 sputter.

3.9. ESTUDIO DEL OÍDO INTERNO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA

Se empleó un microscopio óptico Carl Zeiss modelo Axiolab drb KT. En todas las preparaciones, se determinó el aspecto microscópico y grado de preservación de las siguientes estructuras del oído interno: ganglio de Corti, órgano de Corti, estra vascular, máculas utricular y sacular y espacios endolinfático y perilinfático.

3.10. ESTUDIO DEL OÍDO INTERNO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Este estudio se realizó en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Se empleó un microscopio electrónico de barrido modelo Phillips XL-30. Los cambios más fácilmente cuantificables en la cóclea son la ausencia de células ciliadas internas o externas en el órgano de Corti. Para cuantificar la pérdida de células ciliadas en la cóclea se eligieron 10 células de sostén consecutivas de un área representativa en cada una de las espiras cocleares. Para cuantificar la pérdida de células ciliadas externas en cada espira se escogieron 2 grupos

de 10 células de sostén de longitud cada uno. Los resultados se expresan en porcentaje de pérdida de células ciliadas (figura 3.10).

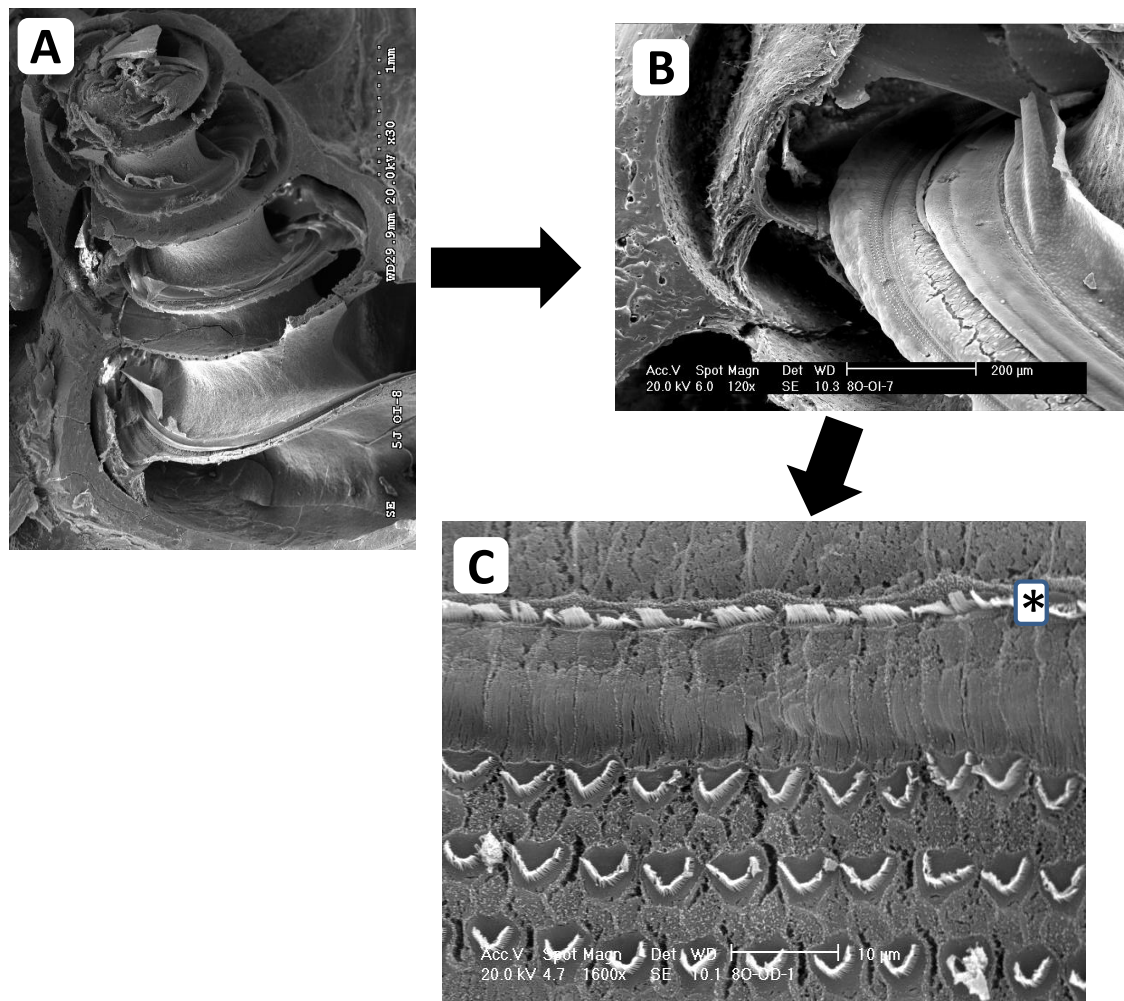


Figura 3.10 Elección de un área representativa de una espira coclear formada por 10 células de sostén consecutivas (1600x). **A:** Imagen panorámica de la cóclea. Se ha abierto ampliamente el hueso para descubrir el órgano de Corti (30x). **B:** Segunda espira coclear (120 x). **C:** Disposición característica de las células ciliadas: las células ciliadas internas (CCI) en una hilera única (*) y las células ciliadas externas (CCE) formando tres hileras, (1600x).

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Se realizó un análisis descriptivo de las variables iniciales para conocer las características generales de la muestra. Los datos se presentaron utilizando estadísticos de tendencia central y de dispersión: media, desviación típica y valores extremos, y para las variables cualitativas el valor absoluto y el porcentaje. Se realizó un estudio de la normalidad de las distribuciones con la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar las variables continuas entre dos grupos, se utilizó el contraste t de Student para muestras independientes y la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica. En el contraste de tres o más medias se realizó un análisis de varianza (ANOVA, *analysis of variance*) entre grupos y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey con el fin de comprobar si los grupos eran homogéneos y, por tanto, se podía comparar el efecto de las distintas variables.

Cuando comparamos las diferencias entre los resultados de los PEATC preinmunización y postinmunización en cada grupo se utilizó la prueba de la t de Student para datos emparejados. Los resultados se presentaron con la media de las diferencias pre-post y el intervalo de confianza del 95% (IC 95%). El análisis de las diferencias entre los resultados obtenidos de los distintos grupos se realizó mediante el ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

En la figura 4.1 se emplearon diagramas de barras de error que representan la media y el IC 95%.

Para comparar la pérdida de células ciliadas externas hallada en los distintos grupos estudiados se utilizaron las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney, el ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa estadístico SPSS v14.0. Todas las pruebas se realizaron en contraste bilateral, con un nivel de significación establecido en valores iguales o inferiores a 0,05.

B) REVISIÓN DE ENSAYOS CLÍNICOS

Se realizó una búsqueda sistemática en PUBMED de aquellos estudios que examinan la respuesta al tratamiento con inhibidores del TNF en pacientes con EIOI o en pacientes con hipoacusia neurosensorial secundaria a otras enfermedades autoinmunes.

En concreto se utilizó la siguiente estrategia de búsqueda: **((“Hearing loss, Sensorineural” [Mesh]) AND (“TNFR-Fc fusion protein” [Supplementary Concept])) OR (“Antirheumatic agents” [Pharmacological Action]) AND (“Hearing loss, Sensorineural” [Mesh]))**.

Así mismo se revisaron las referencias de todos los estudios seleccionados en busca de otros estudios potencialmente relevantes.

Se analizaron los criterios de inclusión, características de la población estudiada, tratamiento utilizado, criterios de respuesta al tratamiento dentro de cada estudio y tasa de respuesta alcanzada. Por último, se destacó si los estudios constituían series de casos o ensayos clínicos controlados y aleatorizados.

IV RESULTADOS

IV RESULTADOS

A) ESTUDIO EXPERIMENTAL

4.1. EXPLORACIÓN OTOVESTIBULAR

4.1.1. Otoscopia

La otoscopia realizada antes de los primeros PEATC no mostró hallazgos patológicos. En algunos animales se encontró cera en el conducto auditivo externo que fue retirada antes de realizar los PEATC. Sólo en un animal se observó un tapón de cerumen muy profundo en el oído izquierdo que no pudo ser eliminado por completo.

En cambio, la otoscopia realizada tras la inmunización coclear y previa a la realización de los segundos PEATC sí mostró algunos cambios en los grupos 1, 2 y 3. Estos cambios se apreciaron en los oídos inmunizados, es decir, en el oído derecho y no en el oído izquierdo.

En el grupo 1 (grupo de tratamiento con 6-metilprednisolona) se halló fenómenos inflamatorios agudos en tres animales. En uno se observó una membrana timpánica algo hiperémica, en otro una membrana timpánica de aspecto azulado (hemotímpano), y finalmente en el tercero una leve otorragia.

En el grupo 2 (grupo de tratamiento con etanercept) sólo dos animales mostraron hallazgos en la otoscopia. En el primero se constató una mínima hiperemia de la membrana timpánica y en el segundo una membrana timpánica de aspecto mate.

En el grupo 3 (controles sin tratamiento) dos animales mostraron cambios inflamatorios: se observó una membrana timpánica de aspecto hiperémico en el primero y mate en el segundo.

Los resultados de la otoscopia se muestran en la tabla 4.1

Tabla 4.1 Otoscopia de los cobayas de los grupos 1 al 4 previa a la realización de los segundos PEATC

Otoscopia

	Membrana timpánica hiperémica	Exudados en caja	Hemotímpano	Otorragia
Grupo MP	1/10	1/10	1/10	1/10
Grupo E	1/10	1/10	0/10	0/10
Grupo CKLH	1/5	1/5	0/5	0/5
Grupo C	0/5	0/5	0/5	0/5

MP: Grupo 1 (6-metilprednisolona); E: Grupo 2 (etanercept); CKLH: Grupo 3 (control KLH); C: Grupo 4 (control PBS)

4.1.2. Alteraciones vestibulares

Tan sólo dos de los animales estudiados presentaron alteraciones conductuales tras la inmunización intracoclear, en relación con una afectación del laberinto derecho. Las alteraciones vestibulares observadas fueron muy discretas en uno de ellos (perteneciente al grupo 1, MP) y más evidentes en el segundo animal (perteneciente al grupo 3, CKLH).

4.2. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO

El estudio con PEATC arrojó los siguientes resultados (tabla 4.2).

Tabla 4.2 Resultados de los PEATC pre y postinmunización (oído derecho)

	COBAYA	PEATC pre (dB)	PEATC post (dB)
Grupo 1 (6-metil prednisolona)	MP-1	25	70
	MP-2	25	60
	MP-3	35	60
	MP-4	40	90
	MP-5	35	80
	MP-6	25	70
	MP-7	30	70
	MP-8	25	65
	MP-9	45	85
	MP-10	30	80
Grupo 2 (Etanercept)	E-1	40	85
	E-2	35	70
	E-3	35	80
	E-4	25	65
	E-5	25	60
	E-6	45	80
	E-7	30	70
	E-8	30	65
	E-9	35	80
	E-10	35	55
Grupo 3 (Control KLH)	CKLH-1	35	85
	CKLH-2	25	80
	CKLH-3	30	90
	CKLH-4	25	85
	CKLH-5	40	90
Grupo 4 (Control PBS)	C-1	30	50
	C-2	25	40
	C-3	35	45
	C-4	25	45
	C-5	30	40

dB: decibelios.

En la figura 4.1 se muestran los umbrales auditivos obtenidos mediante PEATC antes y después de la inmunización en los 4 grupos estudiados.

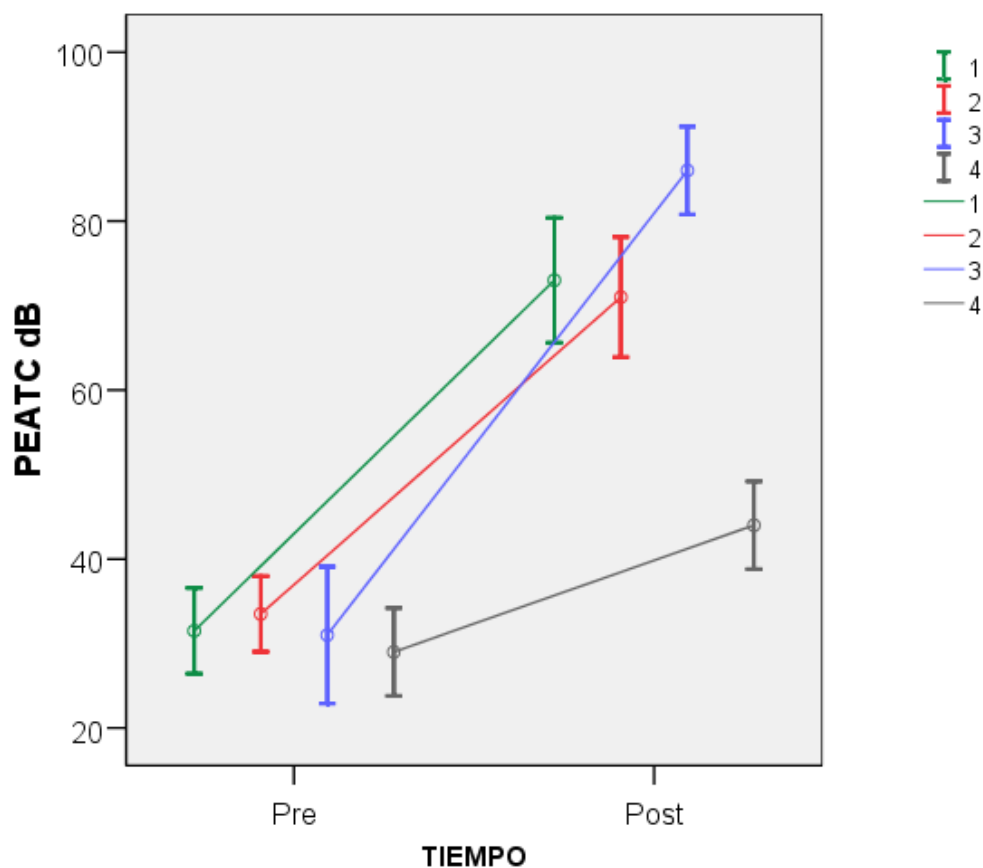


Figura 4.1 Umbrales auditivos pre y postinmunización.

Código de colores: en verde grupo 1 (6-metilprednisolona); en rojo grupo 2 (etanercept); en azul grupo 3 (control KLH); en gris grupo 4 (control PBS).

Se muestran en primer lugar los resultados de los primeros PEATC realizados al inicio del experimento en cada uno de los grupos (tabla 4.3).

Tabla 4.3 Resultados de los primeros PEATC en ambos oídos en los grupos 1 al 4

		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
PEATC pre OD			dB	dB	dB	dB
Grupo	MP	10	31,5	7,0	25	45
	E	10	33,5	6,3	25	45
	CKLH	5	31	6,5	25	40
	C	5	29	4,2	25	35
	Total	30	31,67	6,2	25	45
PEATC pre OI						
Grupo	MP	10	36	14,9	25	75
	E	10	34	6,6	30	50
	CKLH	5	36	8,2	30	45
	C	5	30	7,1	25	40
	Total	30	34,33	10,1	25	75

MP: Grupo 1 (6-metilprednisolona); E: Grupo 2 (etanercept); CKLH: Grupo 3 (control KLH); C: Grupo 4 (control PBS); dB: decibelios.

Los resultados muestran que los grupos son homogéneos y no hay diferencias entre ellos a pesar del pequeño tamaño de la muestra (no se rechaza la hipótesis nula), por lo que se pueden establecer comparaciones entre sí: PEATC preinmunización OD ($p=0,624$), PEATC preinmunización OI ($p=0,743$) (tabla 4.4).

Tabla 4.4 Análisis de varianza (ANOVA) entre grupos (*)

ANOVA					
		Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig
PEATC pre OD	Inter-grupos	71,667	23,889	0,594	0,624
	Intra-grupos	1045	40,192		
	Total	1116,667			
PEATC pre OI	Inter-grupos	136,667	45,556	0,416	0,743
	Intra-grupos	2850	109,615		
	Total	2986,667			

* Se realizó con el fin de comprobar si los grupos eran homogéneos respecto a la audición y, por tanto, se podía comparar el efecto de las distintas variables. PEATC: potenciales evocados auditivos de tronco cerebral.

La variable que se estudió a continuación fue la diferencia entre los primeros y segundos PEATC. En la tabla 4.5 se analiza la diferencia entre los PEATC pre y postinmunización en ambos oídos dentro de cada grupo. En el oído izquierdo sólo se encuentra una diferencia significativa en el grupo 3, aunque esta diferencia (una pérdida de $9 \text{ dB} \pm 4 \text{ dB}$, media \pm desviación típica [DT]) es muy pequeña. En cambio en el oído derecho se observa una pérdida auditiva significativa en todos los grupos, mayor en el grupo 3 ($55 \text{ dB} \pm 5 \text{ dB}$) y mucho menor en el grupo 4 ($15 \text{ dB} \pm 4 \text{ dB}$).

Tabla 4.5 Diferencia entre los PEATC pre y postinmunización en ambos oídos, grupos 1-4

Prueba de muestras relacionadas				95% Intervalo de confianza	95% Intervalo de confianza	
Grupo	dB	Media	Desviación típica	Inferior	Superior	Sig. (bilateral)
MP	Par 1 PEATC pre -PEATC post OD	-41,5	7,5	-46,8	-36,2	0,001
	Par 2 PEATC pre - PEATC post OI	-1	15,6	-12,2	10,2	0,844
E	Par 1 PEATC pre -PEATC post OD	-37,5	7,5	-42,9	-32,1	0,001
	Par 2 PEATC pre - PEATC post OI	-0,5	5,5	-4,4	3,4	0,780
CKLH	Par 1 PEATC pre -PEATC post OD	-55	5,0	-61,2	-48,8	0,001
	Par 2 PEATC pre - PEATC post OI	-9	4,2	-14,2	-3,8	0,009
C	Par 1 PEATC pre -PEATC post OD	-15	5,0	-21,2	-8,8	0,003
	Par 2 PEATC pre - PEATC post OI	1	4,2	-4,2	6,2	0,621

MP: Grupo 1 (6-metilprednisolona); E: Grupo 2 (etanercept); CKLH: Grupo 3 (control KLH); C: Grupo 4 (control PBS); dB: decibelios.

A continuación se comparó la pérdida auditiva en el oído derecho objetivada mediante PEATC entre los diferentes grupos. Se comprueba que existe una diferencia significativa entre el grupo 3 (control KLH) y el resto de los grupos. La pérdida auditiva en el grupo 3 es mayor que en el grupo 4 (control: $p=0,001$) y que en los grupos de tratamiento (grupo 1 metilprednisolona: $p=0,007$; grupo 2 etanercept: $p=0,001$). También es significativa la diferencia entre el grupo 4 y el resto ($p=0,001$). En cambio,

no se obtiene una diferencia cuando se compara el grupo 1 y el grupo 2 ($p=0,566$) (tabla 4.6).

Tabla 4.6 Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Grupo (I)	Grupo (J)	Diferencia de medias (I-J) dB	Error típico	Sig.
MP	E	4	3,1	0,566
	CKLH	-13,5	3,7	0,007
	C	26,5	3,7	0,001
E	MP	-4	3,1	0,566
	CKLH	-17,5	3,7	0,001
	C	22,5	3,7	0,001
CKLH	MP	13,5	3,7	0,007
	E	17,5	3,7	0,001
	C	40	4,3	0,001
C	MP	-26,5	3,7	0,001
	E	-22,5	3,7	0,001
	CKLH	-40	4,3	0,001

MP: Grupo 1 (6-metilprednisolona); E: Grupo 2 (etanercept); CKLH: Grupo 3 (control KLH); C: Grupo 4 (control PBS); dB: decibelios.

4.3. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

4.3.1. Resultados macroscópicos

La exploración directa o mediante lupa quirúrgica de los huesos temporales izquierdos y de los huesos temporales derechos del grupo 4 (control) no mostró hallazgos patológicos más allá de los cambios postquirúrgicos debidos a la realización de la cocleostomía.

En la exploración de los huesos temporales derechos de los grupos 1, 2 y 3 se encontraron los hallazgos que se describen a continuación. En general se observaron cambios en la mucosa del oído medio y en la cóclea, especialmente en la espira coclear, de los oídos inmunizados, siendo estos cambios más acusados en el grupo 3 que en los grupos 1 y 2.

Así, en los cobayas que recibieron 6-metilprednisolona se observó un engrosamiento o hipertrofia de la mucosa de la caja timpánica, que fue leve en 2 animales, moderada en 5 e intensa en 3. En la cóclea los hallazgos consistieron en la presencia de hemorragia en la espira apical, presente en 7 cobayas, de los cuales uno presentó también hemorragia en la tercera espira. Por último, la membrana timpánica presentó una coloración verde amarillenta en un cobaya (en este animal no se observó hemorragia en la espira coclear apical).

En el grupo de los cobayas que recibieron etanercept, 5 presentaron hipertrofia leve de la mucosa del oído medio, 2 moderada y 3 intensa. Se observó hemorragia en la espira apical en 4 animales, y uno de ellos presentó también hemorragia en la tercera espira. Se observó un leve exudado mucoso en el oído medio en un animal y en otro se observó hemorragia en caja timpánica y un granuloma de color achocolatado en el orificio de la cocleostomía (cobaya E-9).

Por último, los cambios observados en el grupo 3 fueron más acusados: hipertrofia severa en 4 de 5 animales, hemorragia en el ápex coclear en todos ellos, y hemorragia en caja del tímpano en dos animales, (tabla 4.7).

Tabla 4.7 Resultados macroscópicos

Grupo	Hipertrofia mucosa			Hemorragia		
	leve	moderada	intensa	Espira apical	3ª espira	Exudados en caja
MP	2/10	5/10	3/10	7/10	1/10	0/10
E	5/10	2/10	3/10	4/10	1/10	2/10
CKLH	1/5	0/5	4/5	5/5	0/5	2/5

MP: Grupo 1 (6-metilprednisolona); E: Grupo 2 (etanercept); CKLH: Grupo 3 (control KLH).

Además de los cambios descritos en el hueso temporal, otros hallazgos observados en los animales inmunizados consistieron en la inflamación y presencia de granulomas en el lugar de inyección del antígeno.

4.3.2. Resultados microscópicos

4.3.2.1. Resultados obtenidos en el grupo piloto

Se objetivaron mediante microscopia óptica signos moderados o intensos de inflamación coclear en las 5 cócleas inmunizadas. En concreto se observó hemorragia y exudados en la rampa timpánica alrededor de la cocleostomía e infiltrados inflamatorios compuestos fundamentalmente por leucocitos polimorfonucleares y macrófagos alrededor de la vena espiral modiolar y las vénulas colectoras, y en la rampa timpánica. En dos casos los hallazgos inflamatorios fueron más intensos mostrando un ligero hidrops endolinfático y cambios degenerativos en el órgano de Corti y la estría vascular. En los demás cobayas los cambios fueron más moderados.

4.3.2.2. Resultados con microscopia electrónica de barrido (MEB)

Para cuantificar la pérdida de células ciliadas externas en la cóclea se procedió como se describe en el apartado de material y métodos (3.10). Los resultados se expresan en porcentaje de pérdida de células ciliadas (cóclea derecha) (tabla 4.8 y figura 4.2).

Tabla 4.8 Resultados microscópicos. Porcentaje de pérdida de células ciliadas

Porcentaje de pérdida de células ciliadas			
Descriptivo			
Grupo	N	Media (%)	Desviación típica (%)
MP	10	39	29,9
E	10	21,5	21,5
CKLH	5	60	14,1
C	5	14	15,2
Total	30	32,5	26,9

MP: Grupo 1 (6-metilprednisolona); E: Grupo 2 (etanercept); CKLH: Grupo 3 (control KLH); C: Grupo 4 (control PBS).

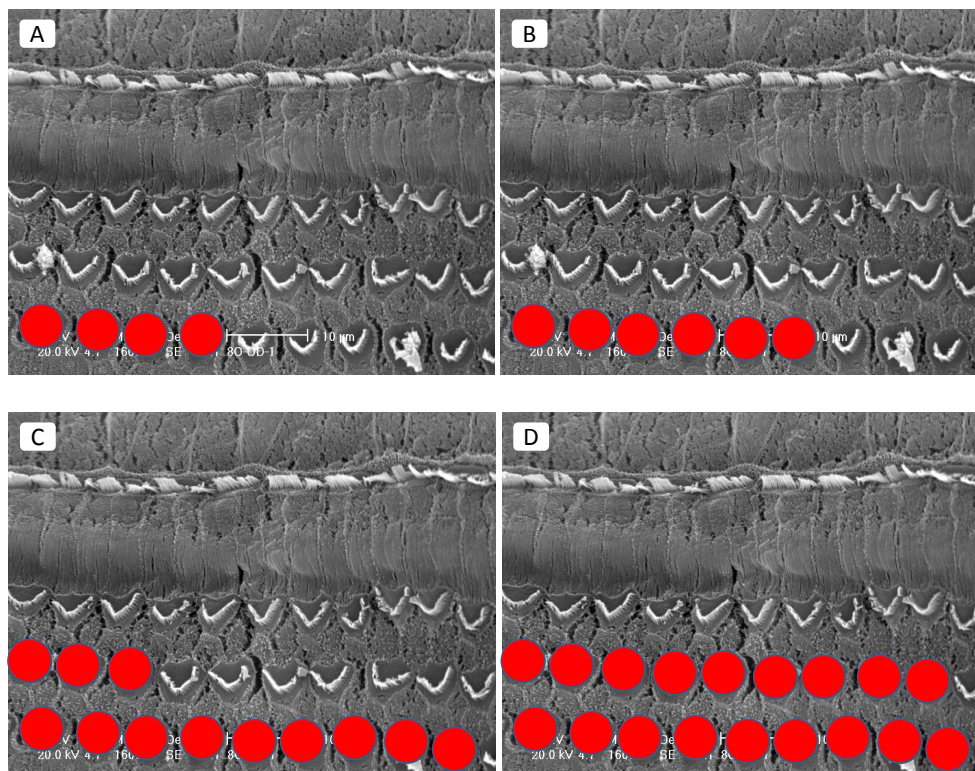


Figura 4.2 Resultados microscópicos. Porcentaje de pérdida de células ciliadas. Los círculos rojos representan las células ciliadas ausentes en los distintos grupos. Ordenado de menor a mayor pérdida: **A)** Grupo 4 (control PBS); **B)** Grupo 1 (6-metilprednisolona); **C)** Grupo 2 (etanercept); **D)** Grupo 3 (control KLH).

Aunque ocasionalmente se observó la ausencia de alguna célula sensorial en las cócleas izquierdas, estos cambios fueron mucho más frecuentes en las cócleas inmunizadas. Se exponen los resultados encontrados en las cócleas derechas. Como se muestra en la tabla 4.9 se hallaron diferencias entre el grupo 3 y los grupos 2 ($p=0,026$) y 4 ($p=0,020$). En el grupo que no recibió tratamiento se observó una mayor pérdida de células ciliadas externas. Aunque el grupo 4 registró menor pérdida de células ciliadas que los grupos 1 y 2 esta diferencia no alcanzó significación estadística.

Tabla 4.9 Resultados microscópicos. Comparación entre grupos

Porcentaje de pérdida de células ciliadas		Comparaciones múltiples		
HSD de Tukey				
grupo (I)	grupo (J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig
Variable dependiente		(%)		
MP	E	17,5	10,3	0,348
	CKLH	-21	12,7	0,366
	C	25	12,7	0,224
E	MP	-17,5	10,3	0,348
	CKLH	-38,5	12,7	0,026
	C	7,5	12,7	0,934
CKLH	MP	21	12,7	0,366
	E	38,5	12,7	0,026
	C	46	14,6	0,020
C	MP	-25	12,7	0,224
	E	-7,5	12,7	0,934
	CKLH	-46	14,6	0,020

MP: Grupo 1 (6-metilprednisolona); E: Grupo 2 (etanercept); CKLH: Grupo 3 (control KLH); C: Grupo 4 (control PBS); HSD: *Honestly Significant Difference*.

A continuación, se comparó la diferencia en la pérdida de células ciliadas externas por espira entre los grupos 1 y 2. Tan sólo en la tercera espira se encontró una pérdida significativamente menor en el grupo tratado con etanercept respecto al grupo tratado con 6-metilprednisolona (44,0% frente a 20,05%; $p=0.029$) (tabla 4.10).

Tabla 4.10 Porcentaje de pérdida de células ciliadas externas por espira

Grupo		espira 1	espira 2	espira 3	espira 4
MP	N	10	10	10	5
	Media	35,0	32,0	44,0	36,0
	DT	33,4	34,9	28,5	15,2
	% Mediana	30,0	20,0	32,5	40,0
	Mínimo	0	0	15	20
	Máximo	80	80	80	50
E	N	10	10	10	7
	Media	10,0	12,0	20,5	40,0
	DT	14,9	24,4	30,3	26,5
	% Mediana	10,0	5,0	15,0	30,0
	Mínimo	0	0	0	30
	Máximo	50	80	100	100

MP: Grupo 1 (6-metilprednisolona); E: Grupo 2 (etanercept); DT: Desviación típica.

En la tabla 4.11 se muestra el número de cobayas dentro de cada grupo que presentó una pérdida igual o superior al 25% de células ciliadas externas o al 20% de células ciliadas internas. También se muestra el número de cobayas en los que se observó fusión de los estereocilios de las células ciliadas.

Tabla 4.11 Número de cobayas dentro de cada grupo que presenta una pérdida igual o superior al 25% de células ciliadas externas (CCE) e igual o superior al 20% de células ciliadas internas (CCI)

	Etanercept	6-metil prednisolona	Control KLH	Control PBS
Pérdida de CCE \geq 25 %	3/10	5/10	5/5	1/5
Pérdida de CCI \geq 20 %	2/10	2/10	4/5	0/5
Fusión de estereocilios	0/10	2/10	3/5	1/5

La figura 4.3 muestra imágenes representativas de la ausencia de CCE en la tercera espira coclear en cada uno de los grupos estudiados. Se puede apreciar como las CCE están más preservadas en los grupos 1, 2 y 4, que en el grupo 3, donde la

desaparición de CCE es mayor. En el cobaya C-5 se observa la ausencia ocasional de CCE en las hileras media e internas. En el cobaya E-8 se aprecia la desaparición aislada de CCE en las hileras media y externa y, además, se pueden observar algunas formaciones de aspecto globular (glóbulos) junto a algunas CCI. El cobaya MP-4 presenta una pérdida ocasional de CCE y una desestructuración mayor de las CCE en las hileras media y externa de la 3ª espira coclear. Finalmente, es evidente la mayor destrucción del órgano de Corti en el cobaya CKLH-5, en el que se aprecia no sólo ausencia de CCE, sino también de CCI en la 3ª espira coclear, y cómo las células de sostén ocupan el espacio que dejan las CCE.

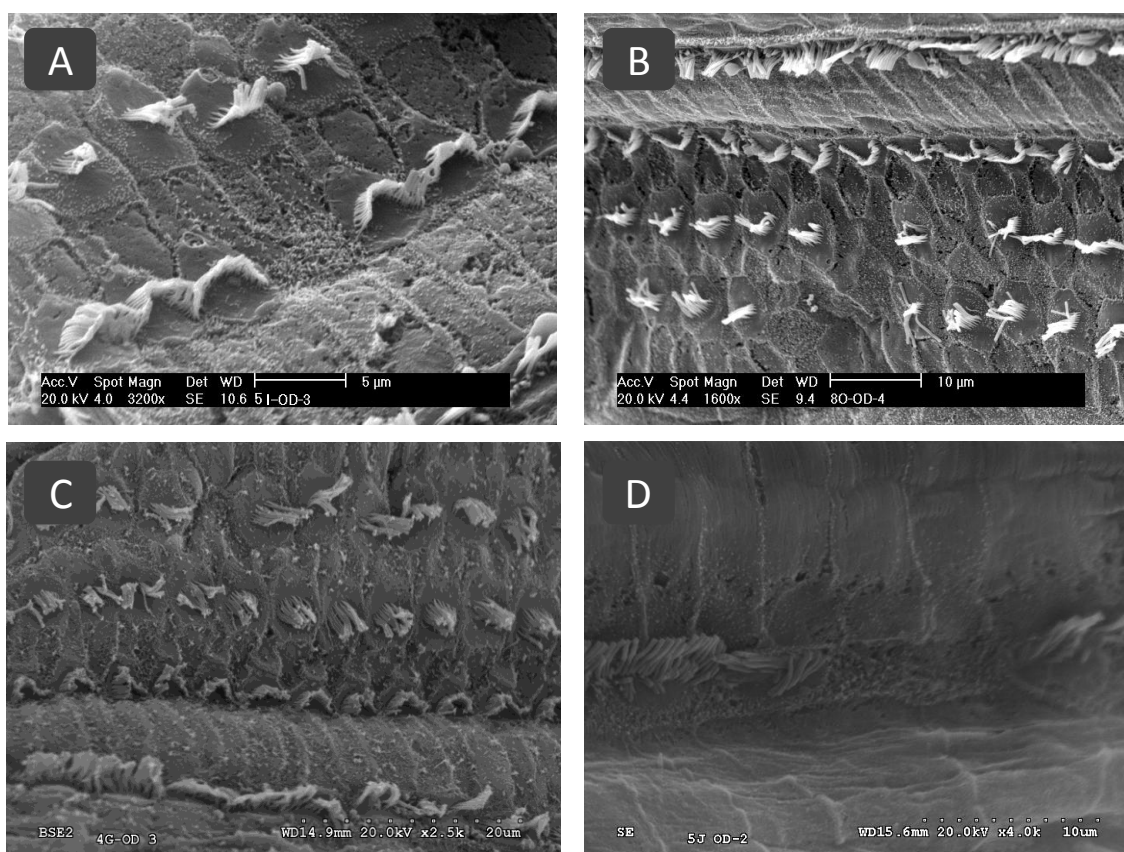


Figura 4.3 Ausencia de CCE en los grupos 1, 2, 3 y 4. A) Fotografía tomada mediante MEB del cobaya C-5 (3200x); B) Cobaya E-8 (1600x); C) Cobaya MP-4 (2500x); D) Cobaya CKLH-5 (4000x).

En el grupo 1 también se observó una ausencia ocasional de CCI en la tercera espira coclear, con preservación de las CCE (figura 4.4).

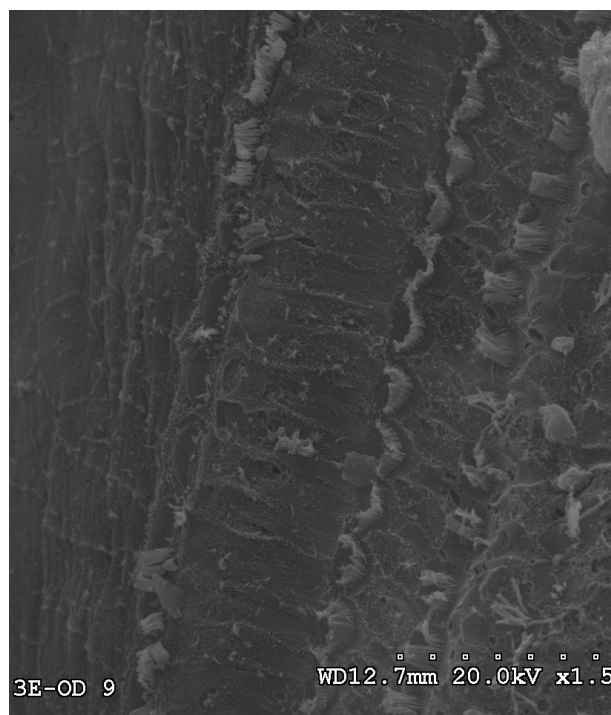


Figura 4.4 Ausencia de CCI en la 3ª espira coclear. Es llamativa la relativa conservación de las CCE. Fotografía tomada mediante MEB del cobaya MP-3 (1500x).

La ausencia de células ciliadas no fue el único hallazgo observado en el estudio de microscopia de barrido. También fue frecuente la aparición de estructuras de aspecto globular en la cutícula de las CCI, hallazgo observado de forma aislada y ocasional en las cócleas izquierdas (figura 4.5).

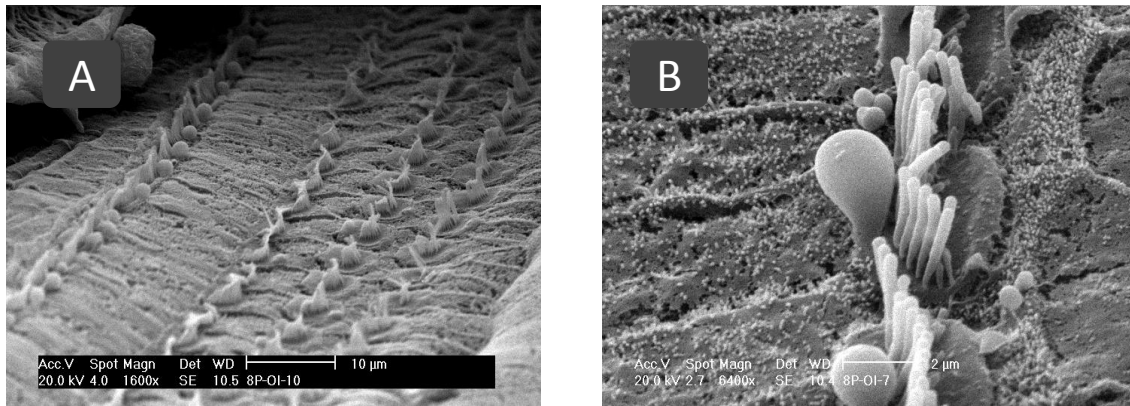


Figura 4.5 Glóbulos (estructuras globulares) junto a las CCI. Fotografías tomadas mediante MEB del oído izquierdo del cobaya E-8. **A)** Conservación y aspecto normal de las CCI y las CCE del órgano de Corti de la 3ª espira coclear. Se observan estructuras de aspecto globular junto a cada una de las CCI (1600 x). **B)** Detalle de los glóbulos en diversos estadios a mayor aumento (6400 x).

En el grupo 2 se observaron glóbulos en las CCI internas de la tercera espira coclear pero no ausencia de las mismas (figura 4.6).

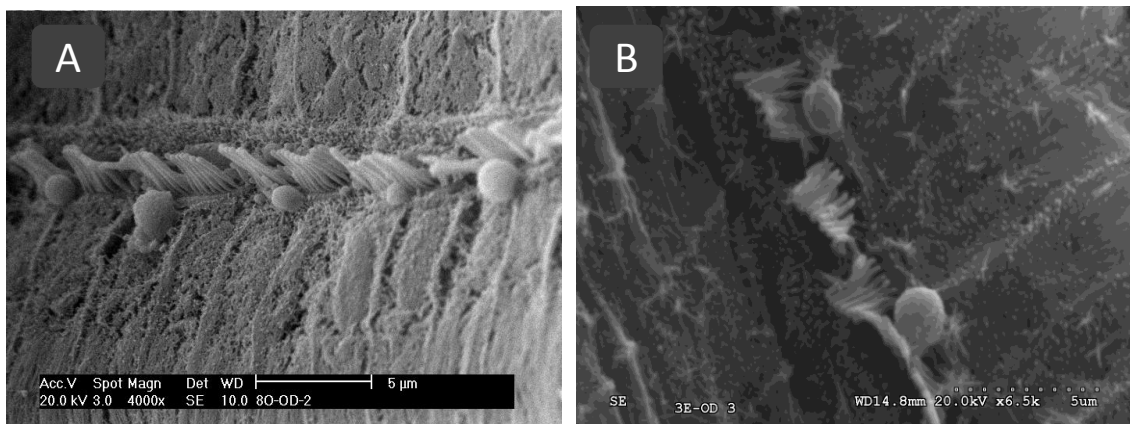


Figura 4.6 Glóbulos junto a las CCI de la 2ª espira coclear. **A)** Fotografía tomada mediante MEB del cobaya E-8 (4000 x). **B)** Fotografía tomada mediante MEB del cobaya MP-3 (6500 x).

También se observaron alteraciones en los estereocilios como la fusión, elongación o desorganización de los mismos (figura 4.7).

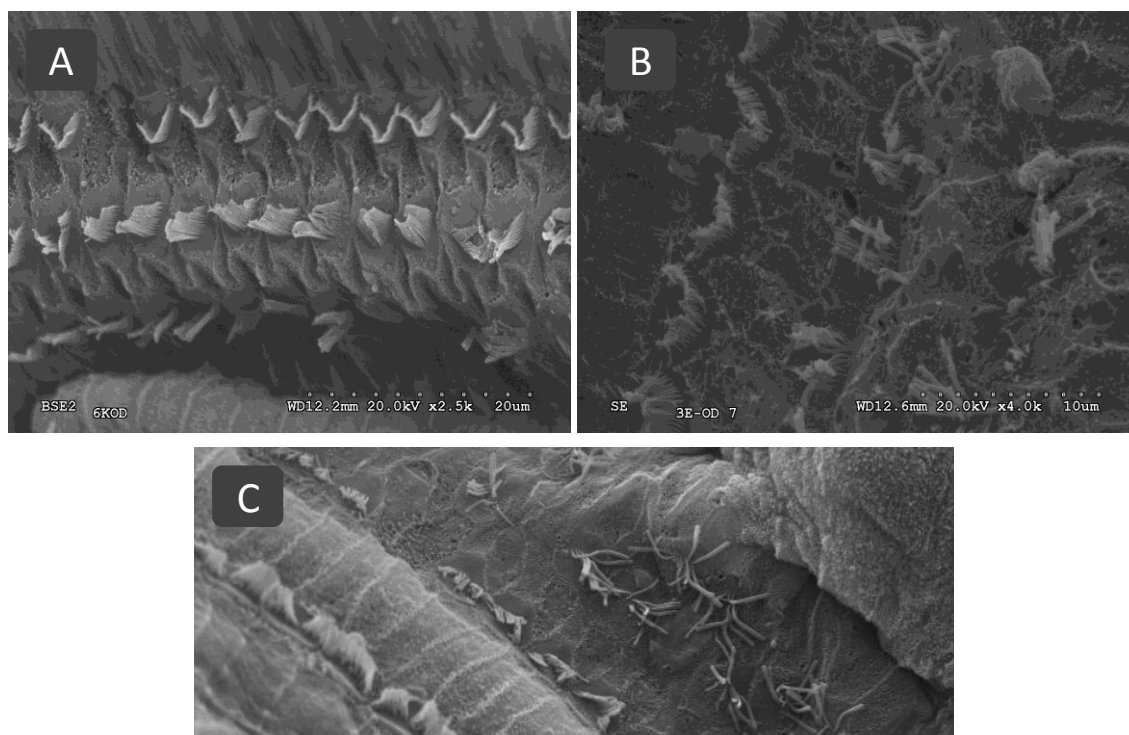


Figura 4.7 Desorganización de los cilios de las CCE de las hileras media y externa de la 3ª espira coclear (A y B) y de la espira basal (C). A) Fotografía tomada mediante MEB del cobaya E-6 (2500x). **B)** Cobaya MP-3 (4000x). **C)** Cobaya CKLH-5 (2000x).

En la figura 4.7 se aprecia una mayor elongación y desorganización de los cilios de las CCE en el cobaya CKLH5 que en los cobayas tratados con 6-metilprednisolona y etanercept.

La figura 4.8 muestra un detalle de la fusión de estereocilios observada en las CCE, hallazgo encontrado en el grupo de cobayas tratado con 6-metilprednisolona pero no en el grupo de cobayas tratado con etanercept.

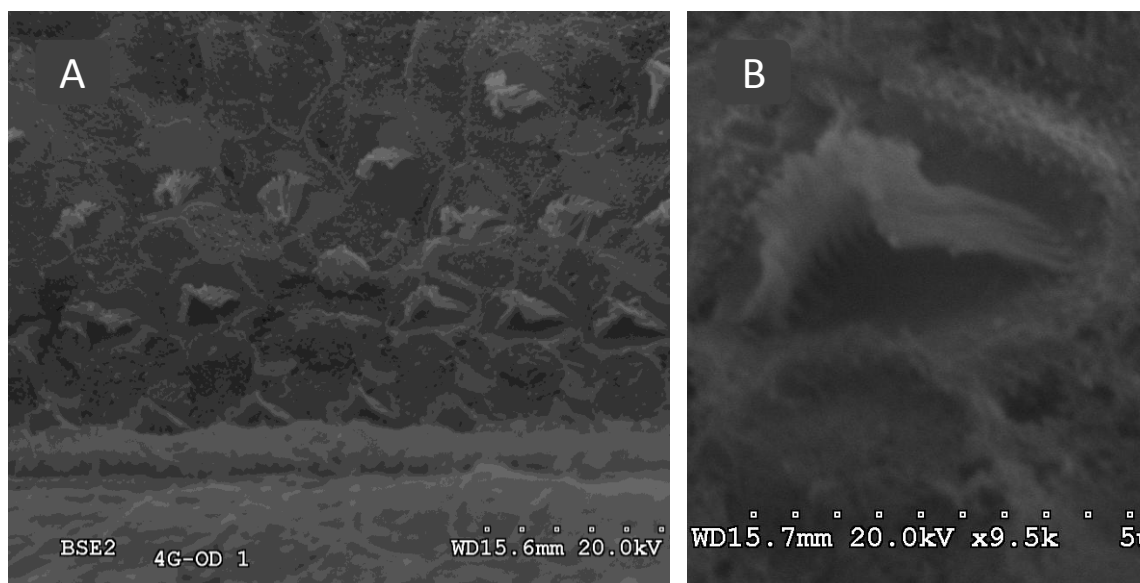


Figura 4.8 Fusión de estereocilios de las CCE de la 2ª espira coclear. Fotografía tomada mediante MEB del cobaya MP-4. **A)** Se observa ausencia de CCE en la hilera externa (2500 x). **B)** Detalle de fusión de los estereocilios (9500 x).

Por último, otros hallazgos infrecuentes fueron la presencia de CCE duplicadas, cambio de orientación o polaridad de las células ciliadas. En la tabla 4.12 se indica el número de cobayas de los grupos 1 y 2 en los que se encontró CCE duplicadas así como otras alteraciones de los estereocilios.

Tabla 4.12 Alteraciones de los estereocilios y presencia de CCE duplicadas

Grupo	Alteraciones en los estereocilios			
	Glóbulos CCI (blebs)	Fusión	Desorganización	CCE duplicadas
6-metilprednisolona	4/10	2/10	5/10	5/10
Etanercept	2/10	0/10	1/10	0/10

Comparación entre el grupo 1 (6-metilprednisolona) y el grupo 2 (etanercept).

En tres cobayas (CKLH-1, MP-1 y MP-3) se observaron artefactos *post mortem* u otros defectos causados por un subóptimo proceso de fijación de las muestras como fueron la presencia de fracturas o colapso de las células ciliadas o de las células de Deiters.

B) REVISIÓN DE ENSAYOS CLÍNICOS CON INHIBIDORES DEL TNF-ALFA

De un total de 207 artículos obtenidos en la búsqueda en PUBMED (revisada hasta enero de 2013) se identificaron un total de 9 artículos relevantes. Cuatro estudios analizan la respuesta al etanercept, tres al infliximab, uno al adalimumab y finalmente un estudio analiza la respuesta al tratamiento combinado de etanercept y metotrexato.

B1. ETANERCEPT

En primer lugar se exponen los resultados obtenidos con etanercept. El estudio de Rahman *et al.* de 2001 es el más antiguo identificado en esta búsqueda (177). En este estudio piloto se analiza la respuesta al etanercept en un grupo de 12 pacientes con hipoacusia neurosensorial, de los cuales sólo uno presentaba hallazgos sugestivos de enfermedad autoinmune sistémica. Los criterios de inclusión utilizados fueron los siguientes: 1) hipoacusia neurosensorial bilateral o síntomas de enfermedad de Menière con hipoacusia progresiva reciente, 2) respuesta clara a altas dosis de esteroides, y/o 3) presencia de anticuerpos anti-HSP70.

Matteson *et al.* y Cohen *et al.* utilizan unos criterios de inclusión parecidos, si bien no descartan los pacientes con hipoacusia unilateral ni tienen en cuenta el resultado del otoblot® (anticuerpos frente a la proteína de 68 kD) y sí excluyen a los pacientes con enfermedades inflamatorias sistémicas como la artritis reumatoide, o el lupus eritematoso sistémico (178, 179).

En los 3 estudios se utilizan similares criterios de respuesta al tratamiento: mejoría de 15 dB en una frecuencia o de 10 dB en dos frecuencias, o mejoría del 12 o el 15% en el reconocimiento de palabras. Sin embargo, en el de Cohen *et al.*, un estudio

controlado con placebo y aleatorizado, sólo se considera una respuesta al tratamiento cuando estos objetivos se logran en la semana octava de tratamiento (179).

Respecto a las características de la población estudiada es muy similar en los tres estudios con una edad media en torno a los 50 años y una distribución homogénea en cuanto al sexo.

En los tres estudios cabe destacar la mínima presentación de efectos secundarios, siendo éstos reacciones locales en el punto de inyección.

El estudio de Scherer *et al.* es el más reciente identificado (207). Se incluyeron 12 pacientes con escasa o nula respuesta a corticoterapia previa. Se obtuvo una respuesta positiva en 6 de 7 pacientes con pérdida auditiva reciente (en 4 se obtuvo una recuperación completa de la pérdida auditiva y en 2 parcial), y tan sólo en uno de 5 pacientes con pérdida auditiva de más de 3 meses de evolución (remisión parcial). De estos 5 pacientes, 3 presentaban alguna enfermedad autoinmune sistémica (AR, CU, EA).

El estudio de Street *et al.* consiste en la exposición de un caso clínico. Se trata de una mujer de 56 años con espondiloartropatía seronegativa que debuta con una sordera súbita en el oído izquierdo con una pérdida pantonal de 40 a 70 dB. A pesar de una buena respuesta inicial a los corticoides vuelve a presentar nuevos episodios de pérdida auditiva brusca, por lo que se decide asociar metotrexato sin que con ello se logre un mejor control. Finalmente se inicia tratamiento con etanercept y se obtiene una buena respuesta: se recupera completamente la audición en frecuencias de 250 a 2000 Hz, persistiendo una pérdida de 50 y 60 dB en 4000 y 8000 Hz respectivamente, similar al audiograma en el oído derecho. Esta respuesta se mantiene dos años después, sin cambios en la audición (180).

La dosis terapéutica y las tasas de respuesta a etanercept se pueden observar en la tabla 4.13 (177-180, 207).

Tabla 4.13 Tasas de respuesta a etanercept

	Matteson et al¹⁷⁸	Rahman et al¹⁷⁷	Cohen et al¹⁷⁹	Street et al^{*180}	Scherer et al²⁰⁷
Año	2005	2001	2005	2006	2010
Nº pacientes	23	12	20	1	12
Edad media	48	47	52	56	44
% mujeres	52	50	60	100	66
% ambos oídos[#]	87	100	90	0	58
% mejoría	30	58	12,5	100	58,3
% estabilización	57	33	NA	NA	NA
EAS	0	1/12	2/20	0	4/12
Dosis	25 mg x 2 cada 7 días sc	igual	igual	igual	igual

EAS: Enfermedad autoinmune sistémica; NA: no aportado; sc: subcutáneo;

* Emplea etanercept y metotrexato; # Porcentaje de pacientes que presentan afectación bilateral.

B2. INFLIXIMAB

A continuación se exponen los resultados de los trabajos de Liu *et al.* (208), Van Wijk *et al.* (193) y Staecker *et al.* (209), que estudian la respuesta a infliximab.

En el estudio de Liu *et al.* (208), se incluyen 8 pacientes (4 hombres y 4 mujeres) diagnosticados de EIOI que no habían respondido previamente a un tratamiento con glucocorticoides, metotrexato y/o ciclofosfamida. Estos pacientes reciben una dosis de 320 a 600 mg de infliximab iv, a intervalos de 4 a 12 semanas. Utilizan criterios de respuesta similares a los descritos anteriormente en los estudios de Rahman, Matteson y Cohen. Sólo un paciente experimenta una mejoría subjetiva de la audición, por lo que se mantiene el tratamiento. En los otros 7 se interrumpe al cabo de 3 a 14 infusiones por falta de respuesta.

Van Wijk *et al.* (193) obtiene una buena respuesta en 7 de 9 pacientes con EIOI (4 hombres y 5 mujeres), tras administrar semanalmente de forma intratimpánica 0,3 ml de infliximab durante 4 semanas, mediante un dispositivo de acetato de polivinilo (Silverstein Micro Wick ®), colocado junto a la ventana redonda a través de un tubo de ventilación. En 5 pacientes se inició el tratamiento con infliximab cuando se observó una pérdida auditiva al disminuir la dosis de corticoides. En los 4 pacientes restantes se comenzó cuando se observó una recidiva después de finalizar el tratamiento con corticoides. En el primer grupo se obtuvo una respuesta positiva en 4 de los 5 pacientes, y en el segundo grupo se obtuvo una respuesta en 3 de los 4 pacientes.

Staecker y Lefebvre exponen un caso clínico (209). Se trata de una mujer de 35 años con enfermedad de Crohn que acude a consulta por hipoacusia bilateral rápidamente progresiva. Al rechazar el tratamiento con glucocorticoides por presentar historia previa de hemorragia gastrointestinal secundaria a tratamiento esteroideo, se inicia tratamiento con infliximab, y se obtiene una mejoría de 15 dB en frecuencias medias y altas.

B3. ADALIMUMAB

Por último se muestran los resultados obtenidos con adalimumab. Morovic *et al.* presentan el caso de una mujer de 30 años con AR e hipoacusia bilateral, que obtiene una mejoría de 15-30 dB en el rango de frecuencias de 250 a 4000 Hz tras recibir tratamiento con adalimumab durante 12 semanas. Previamente se había administrado prednisona oral e intratimpánica durante 4 semanas sin obtener mejoría clínica (190).

En la tabla 4.14 se recogen los resultados obtenidos con infliximab y adalimumab (190, 193, 208, 209).

Tabla 4.14 Otros inhibidores del TNF- α : infliximab y adalimumab

Primer autor	Año	Tratamiento	Pacientes (n)	Edad media	Estabilización o Mejoría (%)	Dosis y vía administración
Liu ²⁰⁸	2011	Infliximab	8	57	0	320-600 mg/4-12 s iv
Van Wijk ¹⁹³ *	2006	Infliximab	9	51	77	0,3 ml/s 4 s transtimpánico
Staecker ²⁰⁹	2002	Infliximab	1	35	100	NA
Morovic ¹⁹⁰	2010	Adalimumab	1	30	100	40 mg/s 12 s sc

iv: intravenoso; NA: no aportado s: semana; sc: subcutáneo.

* En 3 pacientes se obtiene mejoría y en 4 se estabiliza la audición.

Los criterios para evaluar la respuesta terapéutica empleados en los distintos estudios se muestran en la tabla 4.15.

Tabla 4.15 Criterios de respuesta

	Ganancia	
	Audiometría tonal	Audiometría verbal
Matteson ¹⁷⁸	15 dB en 1 frecuencia 10 dB en 2 frecuencias	12 % Dmax
Rahman ¹⁷⁷	15 dB en 1 frecuencia 10 dB en 2 frecuencias	15% Dmax
Cohen ¹⁷⁹ *	10 dB en 2 frecuencias consecutivas	12% Dmax
Street ¹⁸⁰	NA	NA
Scherer ²⁰⁷	15 dB en 2 frecuencias consecutivas 20 dB en 3 frecuencias	NA
Van Wijk ¹⁹³	5 dB PTA	NA
Liu ²⁰⁸	15 dB en 2 frecuencias 10 dB en 3 frecuencias	20% Dmax
Staecker ²⁰⁹	NA	NA
Morovic ¹⁹⁰	NA	NA

* Respuesta alcanzada a las 8 semanas de iniciar el tratamiento.

Dmax: máxima discriminación; NA: no aportado en el estudio; PTA: *Pure Tone Average*. Recuperación auditiva promedio del umbral auditivo a 0,25, 0,5, 1, 2, 4 y 8 KHz.

Matteson *et al.*, Rahman *et al.* y Van Wijk *et al.* recogen en sus estudios el porcentaje de pacientes en los que se estabiliza la audición después de la terapia biológica (177, 178, 193). Van Wijk *et al.* descubre una reducción significativa del número de episodios de pérdida auditiva brusca en los pacientes tratados con infliximab, que pasan de $0,84 \pm 0,4$ (media \pm DT) a $0,028 \pm 0,072$ episodios mensuales. Además compara los resultados obtenidos con el tratamiento combinado de GC e infliximab (en 5 pacientes) con los obtenidos con el tratamiento sólo con infliximab (en 4 pacientes). En el primer grupo se logra estabilizar la audición (definido como periodo en el cual no se produce pérdida auditiva) durante 17 ± 13 semanas, y en el segundo grupo durante 22 ± 13 semanas (193).

Otros datos recogidos en los estudios analizados fueron el tiempo de evolución de la enfermedad antes del reclutamiento, el tiempo transcurrido desde que el paciente refiere pérdida auditiva hasta que se inicia el tratamiento (demora), la duración del tratamiento, el tiempo de seguimiento así como la frecuencia de controles audiométricos realizados (tabla 4.16).

Tabla 4.16 Parámetros temporales

Primer autor	Tratamiento	Nº pacientes	Tiempo de evolución	Demora del tratamiento	Duración del tratamiento	Seguimiento	Controles
Matteson ¹⁷⁸	Etanercept	23	3-120 m	< 3 m *	24 s	24 s	4, 8, 12, 16, 20, 24 s
Rahman ¹⁷⁷		12	2-25 a	< 3 m *	5-10 m	5-12 m	5-12 m [¥]
Cohen ¹⁷⁹		20	4,1 a	< 3 m [£]	8s	12 s	2, 4, 8, 12 s
Street ¹⁸⁰		1	48 h	48h	1 a	> 1a	
Scherer ²⁰⁷		12	ND	< 3 m [§]	12 s	12 s	1, 2, 3, 4, 8, 12 s
Van Wijk ¹⁹³	Infliximab	9	3-85 m	< 3 m	4 s	8-38 s	8-38 s [¶]
Liu ²⁰⁸		8	ND	ND	13-170 s	ND	ND
Staecker ²⁰⁹		1	10 a	ND	ND	> 1 a	ND
Morovic ¹⁹⁰	Adalimumab	1	ND	ND	3 m	< 1 a	12 s

m: meses; a: años; h: horas; s: semanas; ND: no disponible.

* En todos los pacientes del estudio; £ En 5 pacientes del grupo de tratamiento y en 6 pacientes del grupo placebo. En el resto de pacientes la demora fue mayor de 3 meses; § En 7 pacientes la demora fue menor de 3 meses. ¥ Control audiométrico realizado en la fecha más reciente del estudio (osciló entre 5 y 12 meses según el sujeto); ¶ Controles audiométricos realizados en las semanas 1, 2, 3 y 4, y posteriormente de forma variable según el sujeto.

Por otra parte, aunque el objetivo fue evaluar la recuperación o estabilización de la audición tras el tratamiento con un bloqueante del TNF- α , en algunos estudios también se recogen los resultados obtenidos en el control de otros síntomas otológicos, como el vértigo o el tinnitus (tabla 4.17).

Tabla 4.17 Otros síntomas otológicos

	Vértigo		Tinnitus	
	Incidencia (%)	Mejoría (%)	Incidencia (%)	Mejoría (%)
Matteson ¹⁷⁸	69,5	50	91,3	33,3
Rahman ¹⁷⁷	66,6	87,5	100	91,6
Cohen ¹⁷⁹ *	60	25	NA	12,5
Street ¹⁸⁰	0		0	
Scherer ²⁰⁷	50	NA	NA	NA
Van Wijk ¹⁹³	NA	NA	NA	NA
Liu ²⁰⁸	37,5	NA	25	NA
Staecker ²⁰⁹	0		0	
Morovic ¹⁹⁰	0		0	

NA: No aportado.

Finalmente, sólo dos pacientes del estudio de Scherer *et al.* abandonan el tratamiento (siendo excluidos del estudio), y tres pacientes del estudio de Matteson *et al.* interrumpen el tratamiento durante una semana, por aparición de efectos adversos (exantema tras administración de etanercept) (178, 207).

V DISCUSIÓN

V DISCUSIÓN

A) ESTUDIO EXPERIMENTAL

5.1. ELECCIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

En investigación otológica el cobaya es uno de los animales más comúnmente utilizados, debido a la anatomía favorable de su oído que le hace idóneo para el estudio de las funciones básicas de la audición. La bulla laberíntica o timpánica del oído es de gran tamaño, en ella protruye la cóclea y se encuentra la porción final de la cadena osicular. La cóclea se proyecta según un eje antero-inferior apareciendo expuesta toda ella recubierta por una delgada lámina ósea excepto la cara medial de la primera espira.

La posibilidad de acceso quirúrgico al oído medio y a la cóclea permite reproducir aquellos fenómenos patológicos de interés de cara a resolver los interrogantes planteados en la clínica.

Por otra parte, se trata de un animal útil para investigación inmunológica ya que por ejemplo, su complemento en plasma presenta un alto nivel de actividad, y su sistema hormonal e inmune son más parecidos al humano que el de otras especies como el ratón o la rata. Por último, el cobaya se considera una especie tolerante a los corticosteroides ya que el tratamiento con éstos no afecta al número de linfocitos ni al timo mientras que otras especies experimentan una disminución en el número de linfocitos y en el peso del timo. Todo ello hace al cobaya el modelo animal ideal en el presente estudio, y de hecho es el modelo más utilizado en el estudio de la sordera autoinmune.

El rango auditivo o intervalo de frecuencias que percibe el cobaya está comprendido entre los 40-125 y 50 000 Hz, presentando la máxima sensibilidad entre los 500 y 8 000 Hz (210).

5.2. ELECCIÓN DEL MODELO DE LABERINTITIS EXPERIMENTAL AUTOINMUNE

5.2.1. Necesidad de utilizar un modelo animal de laberintitis experimental autoinmune

Los estudios clínicos evalúan la respuesta de los pacientes con EIOI a los distintos tratamientos. Sin embargo, los estudios clínicos no explican cómo actúan los distintos fármacos en el oído interno. Además, no es posible correlacionar la respuesta clínica con hallazgos histopatológicos en el hueso temporal de pacientes con EIOI, dado que no es posible realizar biopsias, por lo que son necesarios estudios experimentales con animales. Estos estudios experimentales son necesarios para conocer el papel de los linfocitos B y T así como otros elementos del sistema inmunitario en la iniciación y progreso de la lesión autoinmune o inmunomediada del oído interno, para conocer la identidad de los autoantígenos a los que se dirige la respuesta autoinmune y para el desarrollo de nuevas terapias inmunosupresoras.

5.2.2. Elección del modelo de laberintitis por *keyhole limpet hemocyanin* (KLH)

El modelo de laberintitis experimental por KLH es un modelo animal (*in vivo*) de inmunidad celular que ha sido utilizado para probar la eficacia de distintos tratamientos (211, 212)

El KLH actúa como un autoantígeno artificial, desencadenando una respuesta inmunitaria frente al oído interno tras la inmunización coclear.

La laberintitis por KLH induce el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares (PMN), monocitos y linfocitos T al espacio perilinfático provocando una pérdida auditiva proporcional al grado de inflamación (67). Además esta pérdida auditiva tiene su correlación anatomopatológica en la degeneración del órgano de Corti, hallazgo no observado con la misma regularidad en otros modelos animales de laberintitis autoinmune (37) (tabla 5.1).

Tabla 5.1 Elección del modelo de laberintitis experimental autoinmune

Modelo animal	Autores	Año	Hallazgos patológicos en el oído interno		
			Degeneración del órgano de Corti	Infiltrado celular	Matriz fibroósea
Homogenado de laberinto membranoso	Soliman ⁵⁹	1989	No	Leve	No
	Yamanobe ⁶⁰	1992	No	Leve	No
	García-Berrocal ³⁷	2004	No	No	No
Enfermedad auto-inmune multisistémica	Nariuchi ²¹³	1994	No	No	No
	Lin ²¹⁴	1997	No	No	No
	Ruckenstein ⁴²	1999	No	No	No
Anticuerpos anti colágeno tipo II	Harris ²¹⁵	1986	No	No	No
	Soliman ²¹⁶	1990	No	No	No
	García-Berrocal ³⁷	2004	No	No	No
Anticuerpos anti KLHRI-3	Nair ³⁶	1997	Si	No	No
Linfocitos T activados	Gloddeck ⁴¹	2002	No	Si	No
	Solares ⁷⁰	2004	No	Si	No
KLH	Woolf ⁶⁷	1986	Si	Severo	Si
	García-Berrocal ³⁷	2004	Si	Severo	Si

Comparación de hallazgos histopatológicos descritos en diferentes modelos. Modificada de García-Berrocal *et al.* (37).

5.3. ELECCIÓN DEL ABORDAJE QUIRÚRGICO

Al escoger el abordaje quirúrgico se tuvo en cuenta la posibilidad de acceder a la escala timpánica y la morbilidad del procedimiento.

Se eligió la vía de abordaje retroauricular epitimpánica ya que permite acceder a la escala timpánica y al mismo tiempo presenta poca morbilidad. Por un lado, permite un acceso rápido a la pared lateral de la cóclea, donde se proyecta y es fácilmente localizable la espira basal, lo que permite abordar la escala timpánica e introducir productos en el oído interno. Por otro lado, presenta escasa morbilidad, ya que es posible mantener indemnes las estructuras del oído al no ser necesario desinsertar la membrana timpánica en sus cuadrantes superiores para visualizar la espira basal de la cóclea. En este estudio se realizaron estudios electrofisiológicos mediante PEATC tras la cirugía, por lo que era fundamental mantener indemnes las estructuras del oído medio y externo del cobaya.

Otras vías de abordaje quirúrgico al hueso temporal y oído en el cobaya como las vías de abordaje superior o epitimpánica e inferior o submandibular descritas por Asarch *et al.* y Sehitoglu *et al.* (217, 218), o la vía transtimpánica, presentan mayor morbilidad. Así, el abordaje submandibular, al tratarse de una vía quirúrgica cervical, entraña un riesgo de lesión de estructuras vasculares y nerviosas de gran relevancia, como son la carótida común, la carótida externa, o los pares craneales IX, X, XI y XII. El abordaje suprameatal o epitimpánico permite acceder al conducto semicircular y al nervio facial, pero no permite un acceso cómodo a la ventana redonda, con riesgo de lesionar estructuras osiculares y nerviosas como el yunque, el estribo, el nervio cuerda del tímpano, o el laberinto posterior. Finalmente, el abordaje transcanal también permite acceder a la cóclea, aunque resulta muy difícil por esta vía su manipulación, por lo que es habitual producir un daño considerable a la membrana timpánica y su inserción, afectando gravemente su capacidad de transmisión del sonido (219).

5.4. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO

5.4.1. Sedación del cobaya

En los primeros animales se eligió la vía intramuscular (en la pata del cobaya) para administrar la anestesia; sin embargo, se observó en algunos casos amputaciones de dedos o incluso del pie. Esto es debido a que la ketamina, que se utiliza en la solución anestésica, puede provocar trastornos prolongados de la sensibilidad de una extremidad cuando se inyecta intramuscularmente favoreciendo la aparición de amputaciones. Por tanto, se pasó a utilizar la vía intraperitoneal. Se debe tener cuidado cuando se administran inyecciones intraperitoneales, puesto que existe riesgo de dañar órganos internos (200).

5.4.2. Exploración funcional de la audición en el cobaya

Entre los primeros estudios experimentales de laberintitis autoinmune destaca el realizado por Beickert en 1961, en el que se descubren anomalías histopatológicas en la cóclea de cobayas inmunizados con tejido isólogo de oído interno (56). No obstante, este estudio no mostraba si estas alteraciones se acompañaban de pérdida auditiva.

Los primeros autores en documentar la pérdida auditiva en un modelo de laberintitis experimental (cobayas inmunizados con tejido coclear homólogo) fueron Terayama y Sasaki mediante el reflejo de Preyer (57).

Posteriormente se ha empleado electrococcleografía (67, 220), otoemisiones acústicas (38, 221) y más recientemente PEATC (59, 60, 68, 222, 223) para medir o cuantificar la pérdida auditiva. Los PEATC representan el método más utilizado en los últimos años. La extensión del análisis a ultra altas frecuencias así como la utilización de potenciales de estado estable constituyen los avances más recientes.

5.4.3. Resultados de los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC)

5.4.3.1. Grupo control KLH

En el presente estudio el grupo de cobayas inmunizados que no recibió tratamiento presentó una pérdida auditiva de $55 \text{ dB} \pm 5 \text{ dB}$ (media \pm DT), similar aunque algo inferior a la obtenida con este modelo en otros estudios. En el estudio de Wang *et al.* (224) la pérdida auditiva fue de $71 \text{ dB} \pm 21 \text{ dB}$, y en el de Ma *et al.* (68) fue de 78 dB (intervalo de 15 a 83 dB) observada tanto a la semana como a las 2 semanas de la inmunización coclear. Estos resultados contrastan con los obtenidos en otros modelos de laberintitis como el modelo de laberintitis experimental mediante suero heterólogo frente al tejido coclear, en el que la pérdida auditiva en los cobayas inmunizados es de alrededor de 10 dB a las 2 semanas de la inmunización (60), observándose dicha pérdida auditiva en tan sólo el 20% de los oídos examinados (59). En el modelo de laberintitis por KLH la pérdida auditiva es reproducible, por lo que es especialmente útil a la hora de valorar la respuesta funcional a diversos tratamientos (211).

5.4.3.2. Grupo 6-metilprednisolona y grupo etanercept

En el presente estudio la pérdida auditiva fue significativamente menor en los grupos de tratamiento que en el grupo sin tratamiento.

Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos por Wang *et al.*, que estudia la respuesta a etanercept utilizando el mismo modelo, observamos que obtiene unos valores similares (224). En cambio, Yang *et al.*, empleando distintos fármacos por vía intratimpánica (ciclosporina, acetato de prednisolona, fluorouracilo y FK-506) en el mismo modelo de laberintitis por KLH en el cobaya, no obtiene una respuesta

significativa. Los autores no atribuyen esta falta de respuesta a la vía de administración empleada (intratimpánica), sino a la incapacidad de demostrar el efecto de los distintos fármacos debido a la gran respuesta inflamatoria provocada por el KLH (211).

Por otro lado, se ha estudiado en el cobaya la capacidad de los glucocorticoides para preservar la audición tras la realización de una cocleostomía, cuando se administran directamente a través de la misma (lo que tiene una aplicación clínica en el tratamiento con implantes cocleares en pacientes con restos auditivos) (225). También se ha estudiado como una respuesta inmunitaria puede influir negativamente en los umbrales auditivos alcanzados tras la colocación de un implante coclear, utilizando un modelo de inmunización con KLH en cobaya, y como esto se puede evitar parcialmente con la aplicación de dexametasona en la ventana redonda antes de la inserción del electrodo (226).

5.4.3.3. Grupo control PBS

En el presente estudio, el grupo control presentó una pérdida de 15 dB de media, concordantes con los resultados obtenidos en los grupos control de otros estudios de laberintitis por KLH. Así, en el estudio de Wang *et al.* el grupo control presentó una pérdida de 10 dB de media (224).

Una pérdida de 0-20 dB es atribuida al trauma quirúrgico (68). En el estudio de Carvalho *et al.*, que evaluaba la pérdida auditiva ocasionada por la realización de una cocleostomía y posterior perfusión de perilinfa artificial o de una solución salina dentro de la cóclea (similar a nuestro grupo control) en ocho cobayas, se observó una pérdida de aproximadamente 10 dB en frecuencias medias (4,8 kHz) a los 3 y 7 días del postoperatorio. Esta pérdida no se limitaba al área tonotópica lesionada por la cirugía sino también a regiones de la cóclea alejadas del lugar de la cocleostomía, aunque de

menor intensidad (227). La pérdida auditiva comenzaba a recuperarse a partir de la 3^a-4^a semana del postoperatorio.

En el presente estudio no se pudo evidenciar la recuperación de esta leve pérdida auditiva ya que todos los animales fueron sacrificados a la primera semana de la inmunización intracoclear.

El hecho de que la agresión quirúrgica ocasiona una pérdida auditiva leve, y que esta se puede recuperar a largo plazo, abre la puerta a la investigación de procedimientos diagnósticos e intervenciones terapéuticas dentro del oído interno (162, 228-231).

Kang *et al.* han estudiado los efectos a largo plazo de la colocación de un implante coclear y la estimulación eléctrica en cobayas. En un número pequeño de animales se observaron lesiones adyacentes al implante, en la espira basal. Sin embargo, en la mayoría de los animales, el estudio histológico no mostró alteraciones ni en las CC ni en las neuronas del ganglio espiral (232). Estos hallazgos tienen su correlación clínica, ya que se han desarrollado procedimientos que tratan de conservar los restos auditivos en pacientes candidatos a un implante coclear. Desde procedimientos quirúrgicos menos agresivos (descritos por Lehnhardt y modificados después por otros autores) (233-235) a la utilización de electrodos más cortos de 10 a 22 mm que no progresan más allá de la espira basal de la cóclea y permiten conservar los restos auditivos en frecuencias graves (236). Estos pacientes pueden beneficiarse así de una estimulación dual (acústica y eléctrica), logrando una mayor inteligibilidad que los pacientes implantados con electrodos de longitud convencional o pacientes con igual pérdida auditiva que usan prótesis auditiva, tanto en situaciones sin ruido como en situaciones con ruido ambiental (237-239).

Por otro lado, la posibilidad de administrar directamente terapias de forma segura y eficaz a la cóclea permitiría aprovechar los recientes avances en regeneración de CC y células ganglionares mediante terapia génica o terapia con células madre (240). De hecho, la búsqueda de sistemas de administración intracoclear de fármacos es un campo muy fértil y activo de investigación en este momento: existen prototipos de catéteres diseñados para poder insertarse en la cóclea utilizando un implante coclear (241-244), y se han desarrollado sistemas de infusión continua (245, 246) así como sistemas alternantes de microfluídos (*reciprocating microfluidic devices*) que permiten una difusión del fármaco a regiones distantes del lugar de administración (247, 248). Estos procedimientos aún se hallan en fase experimental.

5.5. GRUPO PILOTO

Los hallazgos observados mediante microscopia óptica en los animales del grupo piloto (infiltrados inflamatorios en la escala timpánica de la cóclea, alrededor de la vena espiral modiolar y de las vénulas colectoras, diferentes grados de degeneración del órgano de Corti y de la estría vascular), son similares a los obtenidos previamente con este mismo modelo en un estudio de la patología inmunoinducida realizado en el Servicio de ORL del Hospital Puerta de Hierro a finales de los años 90 y primeros años del 2000 (86), y a los descritos anteriormente en animales sensibilizados con KLH (61, 66, 68).

5.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

5.6.1. Métodos de cuantificación de la pérdida de células ciliadas

En el presente trabajo se han utilizado métodos para cuantificar la pérdida de células ciliadas que han sido descritos y empleados en el estudio de otras enfermedades

del oído interno como por ejemplo en estudios experimentales de ototoxicidad por cisplatino (249-251) o trauma acústico (230).

5.6.2. Resultados de MEB en el grupo control PBS

En el presente estudio, el grupo control presentó cambios muy discretos en el órgano de Corti observados mediante MEB.

Tras la realización de una cocleosaculotomía en cobayas se produce una pérdida de células ciliadas en los primeros 3 mm de la espira basal de la cóclea y otros cambios como es la fusión de esterocilios. Esta pérdida de células sensoriales se ha extendido a la tercera espira coclear a las 6 semanas de la cirugía (252). Aunque el modelo utilizado no es del todo comparable al de estos estudios (la cocleostomía se sella en el mismo procedimiento quirúrgico y no se realiza una cocleosaculotomía ni se comunican las diferentes rampas cocleares entre sí), es muy probable que la pérdida auditiva así como los cambios histopatológicos observados en este grupo se deban al procedimiento quirúrgico.

En el grupo control así como en los oídos izquierdos de los cobayas inmunizados se observaron estructuras globulares (glóbulos) en la membrana citoplasmática apical de algunas células ciliadas internas. Se ha descrito la presencia de glóbulos en las CCI de cobayas adultos, en relación con un desequilibrio en los procesos de endocitosis y exocitosis en la membrana citoplasmática apical de las CCI, ligado a una sobrecarga de Na^+ tras el sacrificio del animal, por lo que la presencia de glóbulos en el grupo control así como en los oídos izquierdos (no inmunizados) podría deberse a este mecanismo.

Sin embargo, los glóbulos aparecen también en los procesos de apoptosis (253). En este contexto, los glóbulos se forman en menos de 30 minutos tras la exposición a diversos estímulos, coincidiendo con la pérdida de canales mediados por Cl^- y K^+ y la

activación de la caspasa-3 y la desregulación de la cinasa Rho I. Los glóbulos se forman debido a que se debilitan las uniones de actina entre la membrana plasmática y el citoesqueleto. Cuando los glóbulos se desprenden de la célula, son fagocitados. La alta concentración de autoantígenos en los glóbulos de células apoptóticas, debido a la modificación de estas moléculas por procesos proteolíticos y fosforilativos, ha hecho que se hayan implicado los glóbulos apoptóticos en los mecanismos de autoinmunidad. Una vez que se inicia la respuesta inmune primaria, otros procesos apoptóticos, secundarios a una noxa o a mecanismos homeostáticos, pueden estimular una respuesta inmune secundaria que supere los mecanismos de tolerancia inmunitaria (254, 255) (figuras 5.1 y 5.2). La presencia de glóbulos en las cócleas izquierdas también podría obedecer a un mecanismo autoinmunitario simpático (29-31).

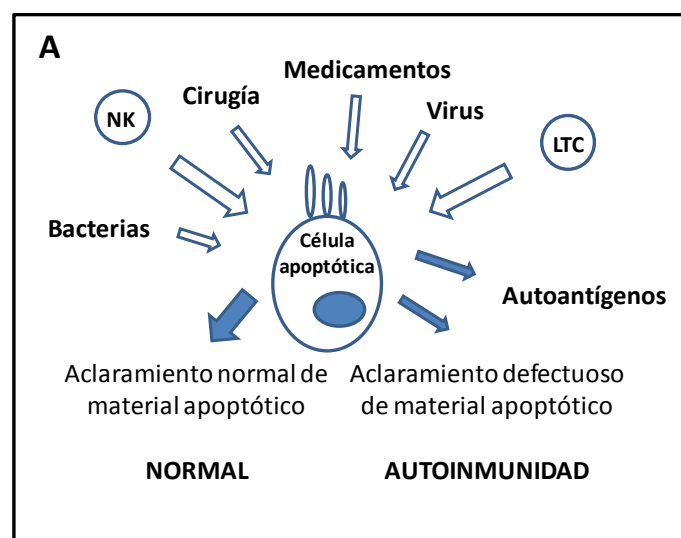


Figura 5.1 Contribución de la apoptosis en los mecanismos autoinmunitarios.

Iniciación de la respuesta autoinmune. LTC: Linfocitos T citotóxicos; NK: Células *Natural Killer*.

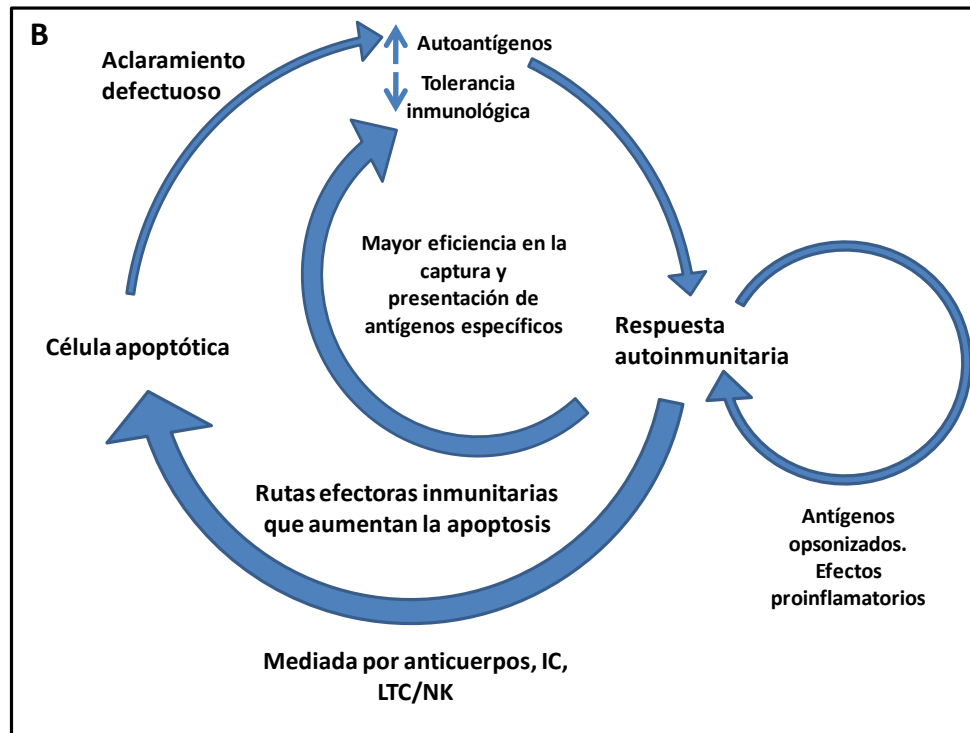


Figura 5.2 Contribución de la apoptosis en los mecanismos autoinmunitarios. Propagación y amplificación de la respuesta autoinmune. IC: Inmunocomplejos; LTC: Linfocitos T citotóxicos; NK: Células *Natural Killer*.

5.6.3. Resultados de MEB en cobayas inmunizados con KLH

La pérdida auditiva (en el grupo 3) se corresponde con importantes alteraciones en el órgano de Corti observadas mediante MEB. La pérdida de células ciliadas es mayor en las espiras apicales de la cóclea, especialmente en la tercera espira, y más acusada en la tercera hilera de CCE, coincidiendo este hallazgo con el descrito por Gloddek *et al.* (38) y Ross *et al.* (221) en un modelo de laberintitis experimental por transferencia de linfocitos T activados. Gloddek *et al.* observan una pérdida frecuente de CCE (al mes de la transferencia de leucocitos activados) en los cobayas inmunizados aunque no cuantifican esta pérdida (38). Ross *et al.* especifican que la pérdida de células ciliadas es mayor en la segunda o tercera hilera de CCE, aunque tampoco cuantifican dicha pérdida, y hallan elongaciones de los estereocilios y protrusiones similares a microvellosidades en las cócleas inmunizadas con más frecuencia que en las cócleas no

inmunizadas o aquellas del grupo control (221), hallazgo igualmente observado en el presente estudio.

Las células ciliadas normalmente están rodeadas por células no sensoriales altamente especializadas denominadas células de soporte. En el presente estudio se ha observado cómo dichas células de soporte se expanden e invaden el espacio vacío dejado por la pérdida de CC. Esta actividad cicatricial de las células de sostén es muy importante para mantener la integridad de la superficie apical del epitelio, evitar fugas y mezclas de los líquidos endolaberínticos, y así proteger al resto de CC y evitar una mayor pérdida auditiva. Una actividad cicatricial excesiva puede sin embargo provocar una pérdida mayor de CC y ocasionar una pérdida auditiva innecesaria.

Otras alteraciones observadas en el presente estudio fueron la fusión y desorganización de los estereocilios. La desorganización de los estereocilios se asocia a una pérdida auditiva de 15 a 30 dB (256, 257).

La presencia de artefactos *post mortem* u otros defectos causados por un subóptimo proceso de fijación de las muestras (fracturas o colapso de las células ciliadas o de las células de Deiters) tan sólo se advirtieron en tres cobayas (un cobaya del grupo 3, el cobaya CKLH-1, y dos del grupo 1, MP-1 y MP-3), constituyendo hallazgos aislados en el resto (258, 259).

5.6.4. Resultados de MEB en cobayas inmunizados con KLH y tratados con glucocorticoides

En el presente estudio, el grupo de cobayas que recibieron 6-MP mostraron menos alteraciones en el órgano de Corti y menor destrucción de CC observadas mediante MEB que el grupo de cobayas inmunizados que no recibió ningún tratamiento.

Otros estudios han analizado la respuesta a GC en otros modelos animales de laberintitis experimental, si bien estos modelos presentan algunos inconvenientes.

Así, en el modelo animal de enfermedad autoinmune multisistémica, no órgano-específica de ratón MRL-Faslpr, aunque se observan cambios en la cóclea como degeneración de la estría vascular y depósito de anticuerpos, no se observa una respuesta inflamatoria (260), y la mejoría de la audición obtenida con los corticoides (261, 262) parece deberse más a su acción mineralocorticoide que a su acción inmunosupresora, ya que con mineralocorticoides como la aldosterona se obtiene el mismo resultado (263, 264).

Por otro lado, se ha estudiado la respuesta al tratamiento con GC en un modelo animal de laberintitis autoinmune inducida por colágeno de tipo II, observando que disminuye el daño ocasionado en el oído interno (265). Sin embargo, este modelo no ha ofrecido resultados reproducibles, ni se ha podido correlacionar siempre la detección de títulos elevados de anticuerpos anticolágeno tipo II con la pérdida auditiva y las lesiones cocleovestibulares (215, 216, 266, 267).

A pesar de la amplia utilización de los GC en el tratamiento de la EIOT, los mecanismos de señalización que explican el efecto otoprotector de los GC, más allá de sus propiedades antiinflamatorias, no se han comenzado a descubrir hasta muy recientemente.

Los glucocorticoides endógenos son importantes en la homeostasis coclear a la hora de limitar y resolver los procesos inflamatorios. Esta afirmación se apoya en la observación de que una adrenalectomía ocasiona una hipersensibilidad al trauma acústico y a la exposición a endotoxinas (268).

Los GC realizan su función al unirse a los receptores de glucocorticoides (GR), que en la cóclea se concentran fundamentalmente en las células del ganglio espiral, en

los fibrocitos del ligamento espiral y en las células de sostén del órgano de Corti (269). El receptor de glucocorticoides se une al ADN y modula la expresión génica. El GR presenta una homología de secuencia significativa con otros receptores nucleares y se une al ADN mediante dos dominios “dedo de cinc” ricos en cisteína. Al unirse al ADN se inicia o modula la transcripción de una gran variedad de genes, incluyendo la proteína antiinflamatoria anexina-1 (ANXA-1). ANXA-1 es un inhibidor de la fosfolipasa A2 y por tanto, disminuye la producción de eicosanoides inflamatorios y regula la función neuroendocrina, el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (270).

El bloqueo de los GR con un antagonista (mifepristona) reduce en más de un 50% el efecto otoprotector de los GC en cultivos de CC explantadas sometidas a TNF- α (271).

Pero los GR también pueden modular la expresión génica sin unirse al ADN, interactuando con otros factores de transcripción como el NFkB, AP-1 o Stat5 (272). El NFkB representa una familia de factores de transcripción responsables de la expresión de genes que controlan el crecimiento celular, la diferenciación, procesos inflamatorios y la supervivencia celular. El NFkB modula varios genes, incluyendo los genes de citocinas y de sus receptores, factores de crecimiento y genes de respuesta al estrés. El papel del NFkB en el tejido neural es complejo, ya que, por un lado, promueve la supervivencia neuronal a través de la transcripción de genes pro-supervivencia y, al mismo tiempo participa en las cascadas de señales que promueven la muerte neuronal (273). En la cóclea se ha visto que puede actuar de forma proinflamatoria y proapoptótica en diversas situaciones como son tras un trauma acústico (274) o la administración de cisplatino (275).

Sin embargo, en otros estudios se ha visto un efecto otoprotector del NFkB. Los ratones *knockout* que carecen de alguna de las subunidades del NFkB presentan una mayor pérdida auditiva con los años y una mayor sensibilidad al ruido (276). El NFkB protege también a las CC de la ototoxicidad por aminoglucósidos (277). La inhibición del NFkB con un péptido inhibidor induce la apoptosis de las CC *in vitro* (278). También se ha observado la muerte celular de las CC explantadas en cultivos celulares sometidos a TNF- α tras inhibir el NFkB. La dependencia de NFkB funcional para la otoprotección mediada por GC se ha demostrado en neuronas del ganglio espiral y en CC.

Otro de los mecanismos de acción de los GR por los que ejercen su acción otoprotectora es a través de la interacción con las vías de señalización celular que pueden influir en la actividad del NFkB, como es la vía del fosfoinositol 3 cinasa/ gen de la proteína cinasa B/ Ikb cinasa (PI3K/Akt/IKK) que finaliza con la fosforilación y degradación de la proteína inhibidora de NFkB (Ikb) que libera NFkB y permite que éste se transloque al núcleo (279). La cascada de señalización es la siguiente: los GC se unen a los GR citosólicos activando PI3K. PI3K activa Akt/PKB a través de la producción de fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3), que da lugar a la fosforilación de IKK. Ésta fosforila Ikb, liberando NFkB.

Por otro lado, los GC no interfieren en la señalización del TNF- α de una forma específica similar a la de un bloqueante del TNF- α , aunque disminuyen la expresión de TNFR1, que aumenta cuando se incrementa la expresión de TNF- α . Los cambios inflamatorios secundarios a TNF- α no son bloqueados por los GC, pero los productos resultantes de la activación de genes antiinflamatorios promueven un equilibrio que resulta en una neutralización de la red de señales inflamatorias (figura 5.3). La acción de los GC es expansiva y más diversa que la de los bloqueantes del TNF.

El resultado final de estas complejas rutas moleculares es la preservación de las CC (como ocurre en el grupo 1) en una situación en la que de otra forma hubiera acabado en la muerte de las mismas (lo que observamos de forma más acusada en el grupo 3).

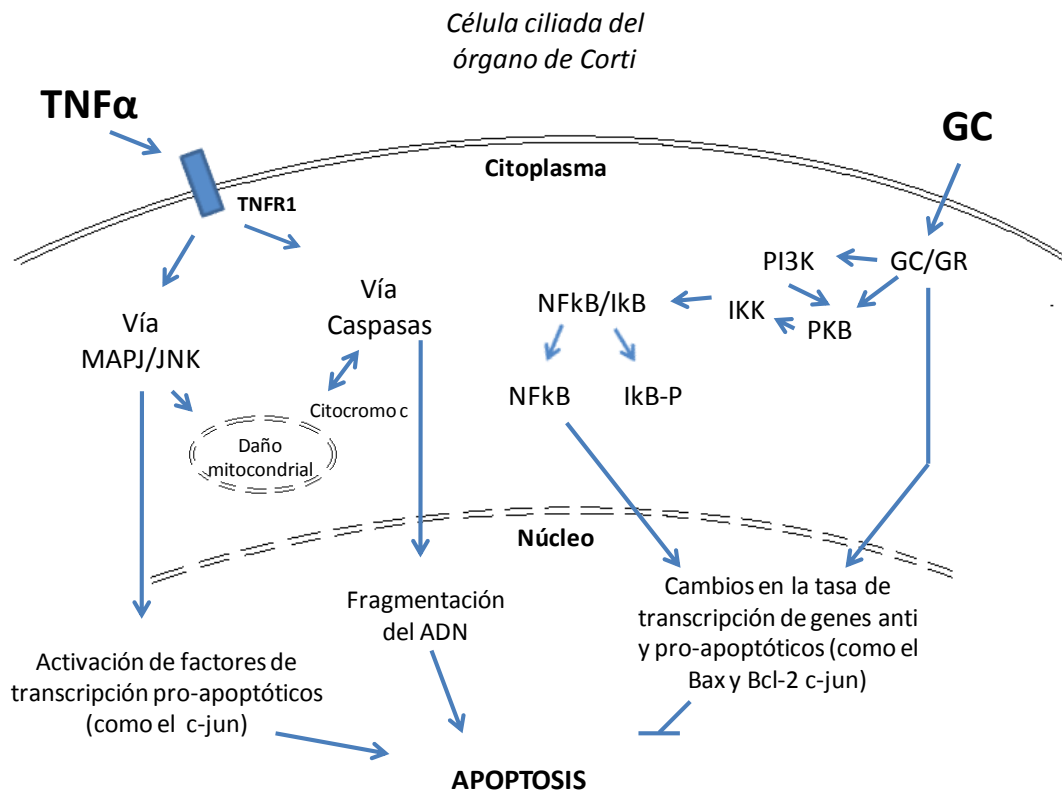


Figura 5.3. Posibles rutas de señalización del TNF- α y activación de NFκB mediada por GC. El TNF- α se une al receptor de membrana celular TNFR1 activando las vías de señalización de MAPK/JNK y caspasas que culminan en la muerte celular de las CC vía apoptosis (modificada de Haake *et al.*) (271).

5.6.5. Resultados de MEB en cobayas inmunizados con KLH y tratados con etanercept

En el presente estudio el grupo de cobayas que recibieron etanercept mostraron menos alteraciones en el órgano de Corti y menor destrucción de CC observadas mediante MEB que el grupo de cobayas inmunizados que no recibió ningún tratamiento.

Hasta la fecha y en conocimiento del autor, no existe ningún otro estudio que haya analizado mediante MEB la respuesta a etanercept en un modelo de laberintitis experimental.

El estudio de Wang *et al.* emplea microscopia óptica para evaluar la inflamación en la cóclea en un modelo de laberintitis experimental por KLH (224). El grado de intensidad de la inflamación lo determina un evaluador independiente, que desconoce la condición experimental, de acuerdo con la cantidad de infiltrado celular en la rampa timpánica, en una escala de 0 a 5 (indicando 0 la ausencia de inflamación y 5 grandes infiltrados de células inflamatorias en todas las espiras cocleares). Las cócleas de los cobayas que recibieron etanercept presentaron menos inflamación coclear que las cócleas de los animales no tratados ($p < 0,01$). La inflamación media en el grupo que recibió etanercept fue $1,8 \pm 1,5$ mientras que en el grupo que no recibió tratamiento fue $3,2 \pm 1,6$. Estos resultados significativos se obtuvieron cuando se administró etanercept tanto por vía intraperitoneal como mediante una bomba osmótica de perfusión continua (5 mg/ml).

En el modelo de laberintitis por KLH, el 30-40% de las células del infiltrado inflamatorio expresan TNF- α durante las primeras 3 a 48 horas tras la inmunización coclear (76). Durante este tiempo, las células inflamatorias se empiezan a concentrar en las espiras cocleares. Los bloqueantes del TNF- α como el etanercept logran reducir esta inflamación, lo que evidencia el papel crítico que desempeña el TNF- α en la

amplificación de la respuesta inflamatoria. Además, el TNF- α aumenta el tono microvascular y reduce el flujo sanguíneo coclear causando un daño isquémico, a través de una ruta de señalización mediada por esfingosina-1-fosfato (207).

Sin embargo el papel del TNF- α no se detiene aquí, ya que tiene un efecto deletéreo directo sobre las CC, como se ha demostrado en muchas otras enfermedades del oído interno.

Diferentes lesiones sobre el oído interno provocan la liberación por parte de los fibrocitos de la pared lateral de la cóclea, de una gran variedad de citocinas, que incluyen el TNF- α , IL-6 e IL-1 β . El TNF- α aumenta en situaciones de hipoxia, pérdida auditiva por vibración, trauma acústico, meningitis bacteriana, ototoxicidad por cisplatino y enfermedad autoinmune del oído interno (76, 275, 279-282).

Se ha observado que la exposición de las CC al TNF- α induce apoptosis. Se comienzan a conocer dichos mecanismos: el TNF- α se une a su receptor TNFR1 y activa la cascada de señalización de muerte celular cinasa c-Jun N-terminal (JNK) así como las caspasas-3 y -8, iniciando los procesos de apoptosis (283), (ver figura 5.3). De hecho, el inhibidor de pancaspasas Boc-d-fmk previene la muerte celular tras la exposición de las CC explantadas a TNF- α (271).

El TNF- α produce una disminución de los niveles de glutatión así como los niveles de otras enzimas antioxidantes, provocando un aumento de los productos reactivos del oxígeno (ROS) y la subsiguiente activación de caspasas que conducen a la apoptosis de las CC (283, 284).

Se ha observado que las CC de la espira apical de la cóclea son más resistentes a la muerte celular programada que el resto de las CC del órgano de Corti (285). De hecho, en experimentos con CC explantadas, las CC de los segmentos apicales son más resistentes al daño ocasionado por la exposición a TNF- α , aunque el mecanismo que

explica esta resistencia no se conoce bien todavía. En el cobaya, se ha demostrado que existen mayores niveles del antioxidante glutatión en las CC de la espira apical que en las CC de la espira basal, lo que podría explicar por qué las CC de la espira basal son más vulnerables (286). Además, las CC de las espiras basal y medias son más susceptibles al TNF- α y la apoptosis. Cuando las CC explantadas son cultivadas en un medio con TNF- α disminuye a la mitad el número de CC viables (287), lo cual es un reflejo de lo que ocurre en las espiras medias y basales del grupo de cobayas inmunizadas con KLH. Los efectos proapoptóticos del TNF- α también se evidencian por la disrupción del patrón y la morfología de las CCI y CCE (288).

Por otro lado, la activación del TNFR1 también puede activar la vía del NFkB, que se ha relacionado en algunos estudios con otoprotección. De hecho, se ha observado *in vitro* que el TNF- α aumenta el NFkB activado en las espiras medias y basales del órgano de Corti. Esto, más que representar un acontecimiento proapoptótico, podría constituir más bien un esfuerzo de las CC dañadas por sobrevivir (287). El NFkB regula la expresión de varios factores antiapoptóticos (Bcl-2 y Bcl-xl) e inhibe la ruta proapoptótica JNK, alterando el nivel de expresión del gen que codifica el factor proapoptótico Bax (289). Hay una disminución del ratio Bax/Bcl-2, lo que favorece la supervivencia celular. Sin embargo, los niveles de NFkB alcanzados tras la activación por TNF- α no alcanzan valores que desencadenen una cascada de señalización que favorezca la supervivencia. De hecho, se ha observado que tras la exposición a TNF- α aumenta el ratio Bax/Bcl-2, conduciendo a la apoptosis de las CC (288). Son necesarios más estudios para conocer los efectos de otros factores de transcripción involucrados en la muerte y supervivencia de las CC.

Finalmente, el TNF- α no es la única citocina activa en la complicada red inflamatoria de la lesión inmunomediada del oído interno, hay muchas más citocinas

implicadas como la IL-1 β , que es expresada por el 30% de las células del infiltrado inflamatorio tras la exposición coclear al antígeno y es también importante en la amplificación de la respuesta (76, 290, 291). Pero es la acción sinérgica de todas estas citocinas la que permite que el TNF- α sea un importante mediador de inflamación y muerte celular. El TNF- α se produce en el oído interno en situaciones de estrés y es un importante mediador de apoptosis de las CC.

En el presente estudio, el número de CC viables en el grupo de cobayas tratado con etanercept se aproxima al del grupo control, y disminuye también las alteraciones morfológicas apoptóticas como se demuestra mediante MEB. Sin embargo, no se logra recuperar del todo la pérdida auditiva, aunque es preciso señalar que se ha evaluado la audición a la semana de la inmunización, y es posible que esta pérdida sea menor si se evalúa la audición en un plazo mayor (1 o 2 meses).

5.7. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ANIMALES TRATADOS CON ETANERCEPT, CON EL GRUPO DE ANIMALES TRATADOS CON GLUCOCORTICOIDES

Cuando se comparan los resultados de PEATC, no hay diferencias significativas en la respuesta alcanzada con los distintos tratamientos; ambos (etanercept y 6-MP) son igualmente eficaces a la hora de revertir la pérdida auditiva en este modelo experimental.

Por otro lado, aunque se observan menores cambios histopatológicos, observados mediante MEB, en el grupo de cobayas tratado con etanercept, estos resultados sólo alcanzan significación estadística cuando se comparan las lesiones observadas en la tercera espira coclear. Cabe destacar que es en la tercera espira coclear donde se produce una mayor lesión de las CCE en los modelos experimentales de

laberintitis por KLH. Esto podría deberse a que el etanercept actúa de forma específica sobre la vía del TNF- α , que como hemos visto previamente, tiene una gran importancia en los procesos de apoptosis de las CCE. Sin embargo, no se traduce en una mayor eficacia en restablecer la pérdida auditiva del etanercept respecto a los GC, lo que podría explicarse por la acción más amplia y menos específica de los GC, que actúan sobre diversas vías de señalización celular, y también por su efecto mineralocorticoide. De hecho, hay evidencias de la presencia de receptores de mineralocorticoides en el oído interno, especialmente en los fibrocitos del ligamento espiral y de la estría vascular (292). Uniéndose a estos receptores, los GC desempeñan un papel importante en la homeostasis del Na⁺ y el K⁺ de los líquidos laberínticos (264).

También se han observado receptores de GC en las células de sostén, que mantienen las condiciones metabólicas y electrolíticas necesarias para el correcto funcionamiento mecánico y bioeléctrico de las células ciliadas (293).

Finalmente, en el presente trabajo no se incluyó un grupo de tratamiento que recibiera etanercept y 6-MP, por lo que no se pueden extraer conclusiones acerca de la eficacia de una terapia combinada en este modelo experimental.

B) REVISIÓN DE ENSAYOS CLÍNICOS

La EIOI continúa representando un reto terapéutico ya que un porcentaje importante de pacientes no responden al tratamiento, y además, la utilización de corticoides a dosis altas durante largos períodos de tiempo se asocia a efectos adversos inaceptables (155). Esto ha impulsado la investigación de nuevos fármacos; así, se ha comenzado a ensayar los bloqueantes del TNF- α , apoyado en los resultados de estudios experimentales (76, 223, 224) y en la evidencia de su eficacia y seguridad en el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes (172, 175, 176).

En el presente trabajo se realiza una revisión de estudios clínicos que evalúan la respuesta a etanercept u otros inhibidores del TNF en pacientes con EIOI. En general se emplean los mismos criterios de respuesta: se consideran respondedores aquellos pacientes cuyo umbral auditivo mejora 15 dB o más en una frecuencia o 10 dB en 2 o más frecuencias consecutivas, o cuya discriminación mejora un 12, un 15 o un 20%. Secundariamente se valora como mejoran otros síntomas como el vértigo o el tinnitus.

En casi todos los estudios analizados el porcentaje de mejoría y estabilización de la audición obtenida con el etanercept y con otros bloqueantes del TNF supera el 70%, lo cual parece apoyar el papel de los inhibidores del TNF en la estabilización de la audición cuando el tratamiento con corticoides fracasa o es inadecuado. Además, en algunos estudios se destaca la mejoría que se obtiene en otros síntomas acompañantes como el vértigo, que depende más de la estabilización de la función vestibular, o el tinnitus.

El estudio de Cohen *et al.* (179), un estudio controlado y aleatorizado, presenta unos resultados más pobres abriendo muchos interrogantes. Matteson *et al.* (178) mantiene el tratamiento durante 24 semanas y Rahman *et al.* (177) durante 6 a 12 meses. Sin embargo, en el estudio de Cohen *et al.* sólo se emplea etanercept durante 8

semanas y se analiza la respuesta buscando significación estadística sólo al final de la octava semana de tratamiento (179). Se apoyan en el hecho de que los pacientes con artritis reumatoide (AR) obtienen una respuesta establecida al cabo de 8 a 12 semanas de tratamiento. No obstante, se acepta la posibilidad de una tasa mayor de respuesta de haber prolongado el tratamiento.

Van Wijk *et al.* (193) sugieren que la falta de respuesta en los pacientes del estudio de Cohen *et al.* (179) se debe a que éstos presentaban enfermedad quiescente, mientras que en su estudio todos los pacientes habían mostrado una respuesta reciente a los corticoides (193). Además este estudio abre la puerta al tratamiento intratimpánico con agentes biológicos como el infliximab.

En el estudio de Liu *et al.* no se observa ninguna respuesta; sin embargo, todos los pacientes eran ya refractarios al tratamiento con corticoides, metotrexato o ciclofosfamida antes de iniciar el ensayo con infliximab (208).

También en el estudio de Scherer *et al.*, los pacientes que presentan peor respuesta al tratamiento son aquellos con hipoacusia neurosensorial de más de tres meses de evolución y, por tanto, con mayor posibilidad de presentar lesiones establecidas, ya irreversibles. De forma interesante, este estudio correlaciona los hallazgos clínicos con un estudio previo en cobayas, que analiza los efectos del TNF- α sobre el flujo sanguíneo coclear, y los autores defienden un posible origen vascular de la pérdida auditiva (207).

En el estudio de Morovic *et al.* se obtiene una respuesta positiva con adalimumab (190). Estos resultados deben analizarse con cautela, ya que se trata de un caso clínico, aunque pueden ser relevantes para la puesta en marcha de estudios prospectivos en los que se emplee este bloqueante del TNF en pacientes con EIOI.

Atendiendo a las características demográficas, los citados estudios presentan una distribución por edad y sexo homogénea. La mayoría de los estudios incluyen pacientes con pérdida auditiva reciente (sin que haya transcurrido más de 3 meses antes del inicio del tratamiento), aunque el tiempo de evolución de la EIOI es mucho más variable. Sólo los estudios de Cohen *et al.*, Scherer *et al.* y Liu *et al.* reclutan pacientes con EIOI que no han presentado un nuevo episodio de pérdida auditiva en los últimos 3 meses, y son los que obtienen una menor respuesta terapéutica (179, 207, 208).

Por otra parte, el seguimiento en las series de Cohen *et al.* y Scherer *et al.* (12 semanas) es menor que en el resto de estudios, que continúan evaluando la respuesta más allá de las doce semanas (179, 207). Esto podría contribuir también a explicar la diferencia de resultados que encontramos entre estos estudios y el resto.

Respecto a la duración del tratamiento, así como la frecuencia de los controles audiométricos, se observa una gran heterogeneidad entre los estudios, por lo que resulta más difícil extraer conclusiones.

Cabe destacar la escasa aparición de efectos adversos en los estudios analizados. El único efecto adverso descrito, en muy pocos casos, consiste en la aparición de un exantema en el lugar de inyección, motivo que lleva a interrumpir el tratamiento sólo a dos pacientes. En contraste con estos resultados, se han descrito eventos adversos graves con el uso de GC en pacientes con EIOI (155). Los datos hallados, relativos a la seguridad de los distintos fármacos biológicos empleados en el tratamiento de la EIOI, son muy positivos, pero deben analizarse con cautela, ya que la muestra es muy pequeña (87 pacientes en total). En otras enfermedades autoinmunitarias como la AR se dispone de mucha más experiencia y de series mucho mayores de pacientes, por lo que podemos acudir a estos estudios a la hora de estimar la probabilidad de aparición de efectos adversos, teniendo en cuenta la dosis empleada, la duración del tratamiento y las

características de la población. En un metaanálisis reciente, se incluyeron 163 estudios controlados y aleatorizados (ECA) con 50 010 participantes y 46 estudios de extensión con 11 954 participantes (294). El objetivo de este metaanálisis fue comparar los efectos adversos del tratamiento con bloqueantes del TNF- α (etanercept, adalimumab, infliximab, golimumab, certolizumab), antagonista de IL-1 (anakinra), antagonista de IL-6 (tocilizumab), anti CD28 (abatacept) y anti células B (rituximab) en pacientes con cualquier enfermedad excepto enfermedad de inmunodeficiencia humana adquirida. La mediana de la duración de los ECA fue de 6 meses y en el resto de estudios de 13 meses. Las tasas de eventos adversos graves, descritos con la utilización de estos tratamientos, como son las infecciones graves, linfoma e insuficiencia cardíaca congestiva, no fueron diferentes entre los productos biológicos y el tratamiento control (294). Sí se encontró una tasa mayor total de eventos adversos (que incluían reacciones locales y reactivación de TBC). En otro metaanálisis que evaluaba la eficacia y seguridad de los bloqueantes del TNF- α en el tratamiento de la AR (25 ECA doble-ciego TNF- α *versus* placebo, con o sin metotrexato concomitante), e incluía más de 9000 participantes, no se encontró un número mayor de abandonos del tratamiento debido a efectos adversos de los bloqueantes del TNF- α (295). En la EIOI son necesarios más estudios para conocer la tasa real de eventos adversos con terapias biológicas.

Por último, ninguno de los estudios revisados realiza un análisis de rentabilidad, aunque el coste de las terapias biológicas es muy superior al del tratamiento con GC. El precio estimado para 8 semanas de tratamiento a las dosis habituales es de aproximadamente 2500 euros en el caso de infliximab, 1000 euros con etanercept, 4500 euros con adalimumab y 50 euros con GC (296).

C) POSIBILIDADES FUTURAS EN EL TRATAMIENTO DE LA EIOI

Además de los inhibidores del TNF- α , recientemente se han comenzado a ensayar otros tratamientos biológicos. El rituximab es un anticuerpo quimérico monoclonal que se une al receptor CD20 de los linfocitos B y disminuye su número. Los pocos estudios en los que se ha empleado el rituximab en pacientes con EIOI ofrecen unos resultados muy esperanzadores, con una tasa alta de respuesta. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder obtener conclusiones fiables (197, 198).

Anakinra es un antagonista de los receptores de IL-1 que ha sido utilizado con éxito en el tratamiento del síndrome CINCA (crónico, infantil, neurológico, cutáneo y articular) y el síndrome de Muckle-Wells (urticaria, hipoacusia neurosensorial progresiva y amiloidosis sistémica AA) que pueden cursar con hipoacusia y forman parte de un grupo de síndromes febriles autoinflamatorios causados por mutaciones en el gen CIAS/NALP3 del cromosoma 1q4432 (297). Estas mutaciones parecen interrumpir los mecanismos de apoptosis y conducir a una sobreexpresión de IL-1 con devastadores efectos proinflamatorios. El papel que pueda tener anakinra en el tratamiento de la hipoacusia neurosensorial autoinmune debe ser aún dilucidado (296).

Otras posibles líneas de tratamiento en la EIOI vendrían representadas por la terapia génica y la terapia con células madre, que tratarían de reparar el daño ya establecido (aunque su papel en el tratamiento de la EIOI podría ser más amplio: también se está estudiando la acción inmunosupresora de algunas células madre mesenquimales sobre las células T autorreactivas) (298). Estas estrategias terapéuticas se fundamentan en el conocimiento de las rutas de señalización celular implicadas en la

formación del epitelio sensorial coclear durante el desarrollo embrionario. Este epitelio sensorial se forma a partir de un grupo de células que tras experimentar varias divisiones, comienzan a diferenciarse en células ciliadas y células de sostén. En reptiles y en aves, las células ciliadas dañadas son reemplazadas gracias a la diferenciación de células de sostén en células ciliadas (299). En mamíferos adultos se pierde esta capacidad de regeneración, por lo que la pérdida de células ciliadas es irreversible (300). La terapia génica y la terapia con células madre intentan invertir esta situación.

Terapia génica

Teóricamente, y actualmente de forma experimental, la terapia génica puede ser utilizada para alterar el microambiente del oído interno y cambiar el fenotipo celular para proteger, preservar, e incluso regenerar las células ciliadas del órgano de Corti (301, 302). Para lograr dicho objetivo, se utilizan distintos vectores víricos. La limitación más importante de este abordaje, más allá de los problemas de seguridad, radica en hacer llegar el vector vírico a todas las regiones de la cóclea (303). Por otro lado, si las células ciliadas regeneradas no se posicionan correctamente, no son funcionales y su presencia no se traduce en una ganancia auditiva (304).

Terapia con células madre

La utilización de células madre se postula como una terapia capaz de regenerar las células ciliadas. Por un lado se están investigando fármacos que modulen la expresión de genes específicos o rutas de señalización celular que permitan a las células de sostén del órgano de Corti humano comportarse como las células de sostén de las aves, y de este modo reactivar características de célula madre, dividirse y diferenciarse en nuevas células ciliadas. Por otro lado, se está estudiando la posibilidad de implantar directamente células madre adultas o embrionarias en la cóclea dañada. Sin embargo,

tanto este abordaje como el anterior presentan las mismas dificultades que la terapia génica (acceso a todas las regiones de la cóclea, integración y maduración de las CC en posición correcta y no en localizaciones ectópicas y riesgo de generar tumores) (305). En el momento actual, la investigación se dirige fundamentalmente a solventar estas dificultades, antes de poder realizar los primeros ensayos clínicos.

VI CONCLUSIONES

VI CONCLUSIONES

1. La inmunización con KLH en el cobaya ocasiona una pérdida auditiva y cambios histopatológicos reproducibles, por lo que constituye un modelo experimental fiable y válido para el estudio de la respuesta a distintos tratamientos.
2. Etanercept, un bloqueante del TNF- α , disminuye la pérdida auditiva, así como la pérdida de células ciliadas del órgano de Corti en este modelo experimental.
3. Etanercept es igual de eficaz que 6-metilprednisolona en recuperar la pérdida auditiva, y evitar las lesiones histopatológicas del órgano de Corti observadas mediante MEB, en este modelo.
4. La realización de una cocleostomía ocasiona una pérdida auditiva leve (de media 10 dB) y discretos cambios histopatológicos en el grupo control.
5. Los resultados de los ensayos clínicos con bloqueantes del TNF- α son contradictorios, si bien en la mayoría de los estudios analizados se observa una mejoría o estabilización de la audición en más del 70 % de los pacientes.
6. Son necesarios más estudios clínicos controlados y aleatorizados para conocer la eficacia del etanercept y otros bloqueantes del TNF- α en el tratamiento de la EIOI.

VII REFERENCIAS

VII REFERENCIAS

1. WITEBSKY E. Concept of autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci* 1966; 135(1):443-50.
2. LEHNHARDT E. Plötzliche Horstörungen auf beiden Seiten gleichzeitig oder nacheinander aufgetreten. *Z Laryngol Rhinol Otol* 1958; 37(1):1-16.
3. KIKUCHI M. On “sympathetic otitis”. *Zibi Rynsio Kyoto* 1959; 52:600-5.
4. MCCABE BF. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979; 88(5 Pt 1):585-9.
5. HUGHES GB, KINNEY SE, BARNA BP, CALABRESE LH. Practical versus theoretical management of autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope* 1984; 94(6):758-67.
6. GARCÍA BERROCAL JR, ARELLANO B, VARGAS JA, TRINIDAD A, RAMÍREZ CAMACHO R, VERGARA J. Enfermedad inmunomediada del oído interno. Presentación de casos clínicos. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1997; 48(7):565-70.
7. GARCÍA-BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R. Papel de la inmunidad en la enfermedad de Menière. En López-Escámez JA, Morales-Angulo C, Pérez-Fernández N, Pérez-Garrigues H, editores. *Enfermedad de Menière: desde las ciencias básicas hacia la medicina clínica*. Badalona: Ediciones Médicas SL; 2009. p. 85-92.
8. MCCABE BF. Autoimmune inner ear disease: results of therapy. *Adv Otorhinolaryngol* 1991; 46:78-81.
9. RAUCH SD, COHEN MA, RUCKENSTEIN MJ. Autoimmune inner ear disease. En Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Richardson MA, Robbins KT, Thomas JR, editores. *Cummings otolaryngology head and neck surgery*. Elsevier; 2010. p. 2164.
10. HUGHES GB, KINNEY SE, BARNA BP, CALABRESE LH. Autoimmune reactivity in Menière’s disease: a preliminary report. *Laryngoscope* 1983; 93(4):410-7.
11. GOTTSCHLICH S, BILLINGS PB, KEITHLEY EM, WEISMAN MH, HARRIS JP. Assessment of serum antibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss and Menière’s disease. *Laryngoscope* 1995; 105(12 Pt 1):1347-52.

12. RAUCH SD, ZURAKOWSKI D, BLOCH DB, BLOCH KJ. Anti-heat shock protein 70 antibodies in Menière's disease. *Laryngoscope* 2000; 110(9):1516-21.
13. GAZQUEZ I, SOTO-VARELA A, ARAN I, SANTOS S, BATUECAS A, TRINIDAD G, ET AL. High prevalence of systemic autoimmune diseases in patients with Menière's disease. *PLoS One* 2011; 6(10): e26759. doi:10.1371/0026759.
14. GARCÍA-BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R. Sudden sensorineural hearing loss: supporting the immunologic theory. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111(11):989-97.
15. GARCÍA-BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R, MILLÁN I, GÓRRIZ C, TRINIDAD A, ARELLANO B, LOBO D. Sudden presentation of immune-mediated inner ear disease: characterization and acceptance of a cochleovestibular dysfunction. *J Laryngol Otol* 2003; 117(10):775-9.
16. GONZÁLEZ-GARCÍA JA, NEVADO J, GARCÍA-BERROCAL JR, SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ C, TRINIDAD A, SANZ R, ET AL. Endogenous protection against oxidative stress caused by cisplatin: role of superoxide dismutase. *Acta Otolaryngol* 2010; 130(4):453-7.
17. NEVADO J, SANZ R, SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ C, GARCÍA-BERROCAL JR, MARTÍN-SANZ E, GONZÁLEZ-GARCÍA JA, ET AL. Ginkgo biloba extract (EGb761) protects against aging-related caspase-mediated apoptosis in rat cochlea. *Acta Otolaryngol* 2010; 130(10):1101-12.
18. MOHR PE, FELDMAN JJ, DUNBAR JL, MCCONKEY-ROBBINS A, NIPARKO JK, RITTENHOUSE RK, ET AL. The societal costs of severe to profound hearing loss in the United States. *Int J Technol Assess Health Care* 2000; 16(4):1120-35.
19. FETTERMAN BL, LUXFORD WM, SAUNDERS JE. Sudden bilateral sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1996; 106(11):1347-50.
20. HUGHES GB, FREEDMAN MA, HABERKAMP TJ, GUAY ME. Sudden sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Clin North Am* 1996; 29(3):393-405.
21. SCHWEINFURTH JM, PARNES SM, VERY M. Current concepts in the diagnosis and treatment of sudden sensorineural hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996; 253(3):117-21.
22. HUANG NC, SATALOFF RT. Autoimmune inner ear disease in children. *Otol Neurotol* 2011; 32(2):213-6.

23. HASHIMOTO S, BILLINGS P, HARRIS JP, FIRESTEIN GS, KEITHLEY EM. Innate immunity contributes to cochlear adaptive immune responses. *Audiol Neurotol* 2005; 10(1):35-43.
24. GREGERSEN PK. Modern genetics, ancient defenses, and potential therapies. *N Engl J Med* 2007; 356(12):1263-6.
25. WALDNER H, COLLINS M, KUCHROO VK. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J Clin Invest* 2004; 113(7):990-7.
26. FUKUDA S, KEITHLEY EM, HARRIS JP. Experimental cytomegalovirus infection: viremic spread to the inner ear. *Am J Otolaryngol* 1988; 9(3):135-41.
27. PAPARELLA MM, SUGIURA S. The pathology of suppurative labyrinthitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1967; 76(3):554-86.
28. SCHINDLER JS, NIPARKO JK. Imaging quiz case 1. Transverse temporal bone fractures (left) with subsequent progressive SNHL, consistent with sympathetic cochleolabyrinthitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124(7):814, 816-8.
29. RICHARDS MI, MOOREHEAD JE, ANTONELLI PJ. Sympathetic cochleolabyrinthitis in revision stapedectomy surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 126(3): 273-80.
30. TEN CATE WJ, BACHOR E. Autoimmune-mediated sympathetic hearing loss: a case report. *Otol Neurotol* 2005; 26(2): 161-5.
31. MACKAY IR, LESKOVSEK NV, ROSE NR. Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun* 2008; 30(1-2):5-11.
32. GARCÍA-BERROCAL JR. El saco endolinfático, órgano de respuesta endocrinoimmunológica. En: *García-Berrocal JR, editor. Enfermedad inmunomediada del oído interno. Barcelona: Ars Medica; 2004. p. 48.*
33. ROSE NR, BONA C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 1993; 14(9):426-30.
34. EATON WW, ROSE NR, KALAYDJIAN A, PEDERSEN MG, MORTENSEN PB. Epidemiology of autoimmune diseases in Denmark. *J Autoimmun* 2007; 29(1):1-9.
35. NAIR TS, PRIESKORN DM, MILLER JM, DOLAN DF, RAPHAEL Y, CAREY TE. KHRI-3 monoclonal antibody-induced damage to the inner ear: antibody staining of nascent scars. *Hear Res* 1999; 129(1-2):50-60.

36. NAIR TS, PRIESKORN DM, MILLER JM, MORI A, GRAY J, CAREY TE. *In vivo* binding and hearing loss after intracochlear infusion of KHRI-3 antibody. *Hear Res* 1997; 107(1-2):93-101.
37. GARCÍA-BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R, TRINIDAD A, ZURITA M, DE LA FUENTE R, LOBO D. Controversies and criticisms on designs for experimental autoimmune labyrinthitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004; 113(5):404-10.
38. GLODDEK B, ROGOWSKI M, REISS G, ARNOLD W. Adoptive transfer of an autoimmunological labyrinthitis in the guinea pig; animal model for a sympathetic cochleolabyrinthitis. *Clin Exp Immunol* 1994; 97(1):133-7 Erratum en *Clin Exp Immunol* 1995; 100:549.
39. IKEZONO T, TOMIYAMA S, PAWANKAR R, JINNOUCHI K, SUZUKI Y, YAGI T. Passive transfer of experimental autoimmune labyrinthitis. *Audiol Neurotol* 2000; 5(5):292-9.
40. GLODDEK B, RYAN AF, HARRIS JP. Homing of lymphocytes to the inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1991; 111(6):1051-9.
41. GLODDEK B, ARNOLD W. Clinical and experimental studies of autoimmune inner ear disease. *Acta Otolaryngol Suppl* 2002; 548:10-4.
42. RUCKENSTEIN MJ, MILBURN M, HU L. Strial dysfunction in the MRL-Fas mouse. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 121(4): 452-6.
43. KUSAKARI C, HOZAWA K, KOIKE S, KYOGOKU M, TAKASAKA T. MRL/MP-lpr/lpr mouse as a model of immune-induced sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1992; 157:82-6.
44. TRUNE DR, CRAVEN JP, MORTON JI, MITCHELL C. Autoimmune disease and cochlear pathology in the C3H/lpr strain mouse. *Hear Res* 1989; 38(1-2):57-66.
45. COGAN DG. Syndrome of nonsyphilitic interstitial keratitis and vestibuloauditory symptoms. *Arch Ophthalmol* 1945; 33:144.
46. GARCÍA-BERROCAL JR, VARGAS JA, VAQUERO M, RAMÓN Y CAJAL S, RAMÍREZ-CAMACHO R. Cogan's syndrome: An oculo-audiovestibular disease. *Postgrad Med J* 1999; 75(883):262-4.
47. GLUTH MB, BARATZ KH, MATTESON EL, DRISCOLL CL. Cogan syndrome: a retrospective review of 60 patients throughout a half century. *Mayo Clin Proc* 2006; 81(4):483-8.

48. LUNARDI C, BASON C, LEANDRI M, NAVONE R, LESTANI M, MILLO E, ET AL. Autoantibodies to inner ear and endothelial antigens in Cogan's syndrome. *Lancet* 2002; 360(9337):915-21.
49. GARCÍA-BERROCAL JR, VARGAS A. Enfermedad inmunomediada del oído interno en las enfermedades autoinmunes sistémicas. En: *García-Berrocal JR, editor. Enfermedad inmunomediada del oído interno. Barcelona: Ars Medica; 2004. p. 30.*
50. MATHEWS J, KUMAR BN. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2003; 28(6):479-88.
51. VELDMAN JE. Immune-mediated inner ear disorders: new syndromes and their etiopathogenesis. En: *Veldman JE, McCabe BF, editores. Oto-immunology. Amsterdam, Holanda: Kugler; 1987. p. 125-41.*
52. ZAVOD MB, SATALOFF RT, RAO VM. Frequency of cochlear enhancement on magnetic resonance imaging in patients with autoimmune sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126(8):969-71.
53. GAZQUEZ I, REQUENA T, ESPINOSA JM, BATUECAS A, LÓPEZ-ESCÁMEZ JA. Genetic and clinical heterogeneity in Meniere's disease. *Autoimmun Rev* 2012; 11:925-6.
54. LÓPEZ ESCÁMEZ JA, VILCHEZ JR, SOTO-VARELA A, SANTO-PEREZ S, PEREZ-GARRIGUES H, ARAN I, ET AL. HLA-DRB1*1101 allele may be associated with bilateral Meniere's disease in southern European population. *Otol Neurotol* 2007; 28(7):891-5.
55. SCHUKNECHT HF. Ear pathology in autoimmune disease. *Adv Otorhinolaryngol* 1991; 46:50-70.
56. BEICKERT P. Zur frage der empfindungsschwerhörigkeit und autoallergie. *Z Laryngol Rhinol Otol* 1961; 40:837-42.
57. TERAYAMA Y, SASAKI Y. Studies on experimental allergic (isoimmune) labyrinthitis in guinea pigs. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1963; 58:49-64.
58. HARRIS JP. Experimental autoimmune sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1987; 97(1):63-76.
59. SOLIMAN AM. Experimental autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope* 1989; 99(2):188-93.
60. YAMANOE S, HARRIS JP. Spontaneous remission in experimental autoimmune labyrinthitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992; 101(12):1007-14.

61. HARRIS JP. Immunology of the inner ear: response of the inner ear to antigen challenge. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1983; 91(1):18-32.
62. HARRIS JP, WOOLF NK, RYAN AF. Elaboration of systemic immunity following inner ear immunization. *Am J Otolaryngol* 1985; 6(3):148-152.
63. TOMIYAMA S, HARRIS JP. The endolymphatic sac: its importance in inner ear immune responses. *Laryngoscope* 1986; 96(6):685-91.
64. HARRIS JP. Immunology of the inner ear: evidence of local antibody production. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1984; 93(2 Pt 1):157-62.
65. HARRIS JP, FUKUDA S, KEITHLEY EM. Spiral modiolar vein: its importance in inner ear inflammation. *Acta Otolaryngol* 1990; 110(5-6):357-65.
66. GARCÍA-BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R, ZURITA M, ARELLANO B. La respuesta celular inmune precoz en la laberintitis experimental: un estudio inmunohistoquímico. *Acta Otorrinolaryngol Esp* 2000; 51(7):557-61.
67. WOOLF NK, HARRIS JP. Cochlear pathophysiology associated with inner ear immune responses. *Acta Otolaryngol* 1986; 102(5-6):353-64.
68. MA C, BILLINGS P, HARRIS JP, KEITHLEY EM. Characterization of an experimentally induced inner ear immune response. *Laryngoscope* 2000; 110(3 Pt 1):451-6.
69. GARCÍA-BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R, AMORIM-GAUDENCIO C. Alterações cocleares em laberintite experimental: da resposta celular à ossificação. *Rev Port Otorrinolaringol* 2004; 42:45-51.
70. SOLARES CA, EDLING AE, JOHNSON JM, BAEK MJ, HIROSE K, HUGHES GB, ET AL. Murine autoimmune hearing loss mediated by CD4+T cells specific for inner ear peptides. *J Clin Invest* 2004; 113(8):1210-7.
71. IKEZONO T, OMORI A, ICHINOSE S, PAWANKAR R, WATANABE A, YAGI T. Identification of the protein product of the Coch gene (hereditary deafness gene) as the major component of bovine inner ear protein. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1535(3):258-65.
72. BILLINGS P. Experimental autoimmune hearing loss. *J Clin Invest* 2004; 113(8):1114-7.
73. DISHER MJ, RAMAKRISHNAN A, NAIR TS, MILLER JM, TELIAN SA, ARTS HA, ET AL. Human autoantibodies and monoclonal antibody KHRI-3 bind to a phylogenetically conserved inner-ear-supporting cell antigen. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 830:253-65.

74. NAIR TS, KOZMA KE, HOEFLING NL, KOMMAREDDI PK, UEDA Y, GONG TW, ET AL. Identification and characterization of choline transporter-like protein 2, an inner ear glycoprotein of 68 and 72 kDa that is the target of antibody-induced hearing loss. *J Neurosci* 2004; 24(7):1772-9.
75. ZAJIC G, NAIR TS, PTOK M, VAN WAES C, ALTSCHULER RA, SCHACHT J, ET AL. Monoclonal antibodies to inner ear antigens: I. Antigens expressed by supporting cells of the guinea pig cochlea. *Hear Res* 1991; 52(1):59-71.
76. SATOH H, FIRESTEIN GS, BILLINGS PB, HARRIS JP, KEITHLEY EM. Tumor necrosis factor-alpha, an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope* 2002; 112(9):1627-34.
77. SATOH H, FIRESTEIN GS, BILLINGS PB, HARRIS JP, KEITHLEY EM. Proinflammatory cytokine expression in the endolymphatic sac during inner ear inflammation. *J Assoc Res Otolaryngol* 2003; 4(2):139-47.
78. SATOH H, BILLINGS P, FIRESTEIN GS, HARRIS JP, KEITHLEY EM. Transforming growth factor beta expression during an inner ear immune response. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006; 115(1):81-8.
79. BODMER D, BRORS D, PAK K, KEITHLEY EM, MULLEN L, RYAN AF, GLODDEK B. Inflammatory signals increase Fas ligand expression by inner ear cells. *J Neuroimmunol* 2002; 129(1-2):10-7.
80. ZHANG C, HUANG W, SONG H. Expression of vascular cell adhesion molecule-1, alpha4-integrin and L-selectin during inner ear immunity reaction. *Acta Otolaryngol* 2000; 120(5):607-14.
81. SUZUKI M, HARRIS JP. Expression of intercellular adhesion molecule-1 during inner ear inflammation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104(1):69-75.
82. GLODDEK B, LAMM K, ARNOLD W. Pharmacological influence on inner ear endothelial cells in relation to the pathogenesis of sensorineural hearing loss. *Adv Otorhinolaryngol* 2002; 59:75-83.
83. ICHIMIYA I, KURONO Y, HIRANO T, MOGI G. Changes in immunostaining of inner ears after antigen challenge into the scala tympani. *Laryngoscope* 1998; 108(4 Pt 1):585-91.
84. GARCÍA BERROCAL JR, MÉNDEZ-BENEGASSI I, MARTÍN C, RAMÍREZ-CAMACHO R. Intervención de los fibrocitos del ligamento espiral en la regulación metabólica del oído interno. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2008; 59(10):494-9.

85. GARCÍA-BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R. Immune response and immunopathology of the inner ear: an update. *J Laryngol Otol* 2000; 114(2):101-7.
86. GARCÍA-BERROCAL JR. “Estudio de la patología inmunoinducida en el oído interno” [Tesis Doctoral]. [Madrid]: Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Madrid; 1996. 214 p.
87. GARCÍA-BERROCAL JR. Respuesta inmunitaria e inmunopatología del oído interno. En: *García-Berrocal JR, editor. Enfermedad inmunomediada del oído interno. Barcelona: Ars Medica; 2004. p. 30.*
88. YOON TH, PAPARELLA MM, SCHACHERN PA, ALLEVA M. Histopathology of sudden hearing loss. *Laryngoscope* 1990; 100(7):707-15.
89. MCCABE BF. Autoimmune inner ear disease: therapy. *Am J Otol* 1989; 10(3):196-7.
90. HAYNES BF, KAISER-KUPFER MI, MASON P, FAUCI AS. Cogan syndrome: studies in thirteen patients, long-term follow-up, and a review of the literature. *Medicine* 1980; 59(6):426-41.
91. LOVEMAN DM, DE COMARMOND C, CEPERO R, BALDWIN DM. Autoimmune sensorineural hearing loss: clinical course and treatment outcome. *Semin Arthritis Rheum* 2004; 34(2):538-43.
92. HUGHES GB, BARNA BP, KINNEY SE, CALABRESE LH, NALEPA NJ. Clinical diagnosis of immune inner-ear disease. *Laryngoscope* 1988; 98(3):251-3.
93. RAMÍREZ-CAMACHO R. Perfil clínico del paciente con afectación cocleovestibular inmunomediada. En: *García-Berrocal JR, editor. Enfermedad inmunomediada del oído interno. Barcelona: Ars Medica; 2004. p.85.*
94. KNUDSON RM, KALAAJI AN, BRUCE AJ. The management of mucous membrane pemphigoid and pemphigus. *Dermatol Ther* 2010; 23(3):268-80.
95. CARLSON JA, CHEN KR. Cutaneous vasculitis update: small vessel neutrophilic vasculitis syndromes. *Am J Dermatopathol* 2006; 28(6):486-506.
96. GARCÍA-BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R, VARGAS JA, MILLÁN I. Does the serological testing really play a role in the diagnosis of immune-mediated inner ear disease? *Acta Otolaryngol* 2002; 122(3):243-8.
97. LOBO D, LÓPEZ FG, GARCÍA-BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R. Diagnostic tests for immunomediataed hearing loss: a systematic review. *J Laryngol Otol*. 2008; 122(6):564-73.

98. MCCABE BF, MCCORMICK KJ. Tests for autoimmune disease in otology. *Am J Otol* 1984; 5(6):447-9.
99. HUGHES GB, BARNA BP, KINNEY SE, CALABRESE LH, NALEPA NL. Predictive value of laboratory tests in “autoimmune inner ear disease”: preliminary report. *Laryngoscope* 1986; 96(5): 502-5.
100. HUGHES GB, MOSCICKI R, BARNA BP, SAN MARTIN JE. Laboratory diagnosis of immune inner ear disease. *Am J Otol* 1994; 15(2):198-202.
101. HELFGOTT SM, MOSCICKI RA, SAN MARTIN J, LORENZO C, KIEVAL R, MCKENNA M, ET AL. Correlation between antibodies to type II collagen and treatment outcome in bilateral progressive sensorineural hearing loss. *Lancet* 1991; 337(8738):387-9.
102. BOULASSEL MR, TOMASI JP, DEGGOUJ N, GERSDORFF M. COCH5B2 is a target antigen of anti-inner ear antibodies in autoimmune inner ear diseases. *Otol Neurotol* 2001; 22(5):614-8.
103. PHAM BN, RUDIC M, BOUCCARA D, STERKERS O, BELMATOUG N, BÉBÉAR JP, ET AL. Antibodies to myelin protein zero (P0) protein as markers of autoimmune inner ear diseases. *Autoimmunity* 2007; 40(3): 202-7.
104. MATSUOKA H, CHENG KC, KRUG MS, YAZAWA Y, YOO TJ. Murine model of autoimmune hearing loss induced by myelin protein P0. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108(3):255-64.
105. YOO TJ, SHEA J JR, GE X, KWON SS, YAZAWA Y, SENER O, ET AL. Presence of autoantibodies in the sera of Meniere’s disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001; 110(5 Pt 1):425-9.
106. BOULASSEL MR, TOMASI JP, DEGGOUJ N, GERSDORFF M. Identification of beta-actin as a candidate autoantigen in autoimmune inner ear disease. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2000; 25(6):535-41.
107. MAGUCHI S, FUKUDA S, CHIDA E, TERAYAMA Y. Myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated sensorineural hearing loss. *Auris Nasus Larynx* 2001; 28 Suppl:S103-6.
108. CADONI G, FETONI AR, AGOSTINO S, DE SANTIS A, MANNA R, OTTAVIANI F, ET AL. Autoimmunity in sudden sensorineural hearing loss: possible role of anti-endothelial cell autoantibodies. *Acta Otolaryngol Suppl* 2002; 548:30-3.
109. MOSCICKI RA, SAN MARTIN JE, QUINTERO CH, RAUCH SD, NADOL JB JR, BLOCH KJ. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive

- hearing loss. Correlation with disease activity and response to corticosteroid treatment. *JAMA* 1994; 272(8):611-6.
110. RAUCH SD, SAN MARTIN JE, MOSCICKI RA, BLOCH KJ. Serum antibodies against heat shock protein 70 in Meniere's disease. *Am J Otol* 1995; 16(5):648-52.
111. OTTAVIANI F, CADONI G, MARINELLI L, FETONI AR, DE SANTIS A, ROMITO A ET AL. Anti-endothelial autoantibodies in patients with sudden hearing loss. *Laryngoscope* 1999; 109(7 Pt 1):1084-7.
112. BOULASSEL MR, DEGGOUJ N, TOMASI JP, GERSDORFF M. Inner ear autoantibodies and their targets in patients with autoimmune inner ear diseases. *Acta Otolaryngol* 2001; 121(1):28-34.
113. YAMAWAKI M, ARIGA T, GAO Y, TOKUDA A, YU JS, SISMANIS A, ET AL. Sulfoglucuronosyl glycolipids as putative antigens for autoimmune inner ear disease. *J Neuroimmunol* 1998; 84(2):111-6.
114. VELDMAN JE, ROORD JJ, O'CONNOR AF, SHEA JJ. Autoimmunity and inner ear disorders: an immune-complex mediated sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1984; 94(4):501-7.
115. KANZAKI J, O-UCHI T. Circulating immune complexes in steroid-responsive sensorineural hearing loss and the long term observation. *Acta Otolaryngol [Suppl] (Stockh)* 1983; 393:77-84.
116. GARCÍA-BERROCAL JR, VARGAS JA, RAMÍREZ-CAMACHO RA, GONZÁLEZ FM, GEA-BANACLOCHE JC, VERGARA J, ET AL. Deficiency of naive T cells in patients with sudden deafness. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123:712-7. Erratum in: *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123(7):1172.
117. PLAZA G, DURIO E, HERRÁIZ C, RIVERA T, GARCÍA-BERROCAL JR. Consenso sobre el diagnóstico y tratamiento de la sordera súbita. Asociación Madrileña de ORL. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2011; 62(2):144-57.
118. HARRIS JP, SHARP PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1990; 100(5):516-24.
119. BLOCH DB, SAN MARTIN JE, RAUCH SD, MOSCICKI RA, BLOCH KJ. Serum antibodies to heat shock protein 70 in sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121(10):1167-71.

120. BILLINGS PB, KEITHLEY EM, HARRIS JP. Evidence linking the 68 kilodalton antigen identified in progressive sensorineural hearing loss patient sera with heat shock protein 70. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104(3):181-8.
121. BONAGURI C, ORSONI JG, ZAVOTA L, MONICA C, RUSSO A, PELLISTRI I ET AL. Anti-68 kDa antibodies in autoimmune sensorineural hearing loss: are these autoantibodies really a diagnostic tool? *Autoimmunity* 2007; 40(1):73-8.
122. RAMÍREZ-CAMACHO R, CITORES MJ, TRINIDAD A, VERDAGUER JM, GARCÍA-BERROCAL JR, MARERO AM ET AL. HSP-70 as a nonspecific early marker in cisplatin ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 2007; 127(6):564-7.
123. YEOM K, GRAY J, NAIR TS, ARTS HA, TELIAN SA, DISHER MJ, ET AL. Antibodies to HSP-70 in normal donors and autoimmune hearing loss patients. *Laryngoscope* 2003; 113(10):1770-6.
124. GARCÍA BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R, ARELLANO B, VARGAS JA. Validity of the western blot immunoassay for heat shock protein-70 in associated and isolated immunorelated inner ear disease. *Laryngoscope* 2002; 112(2):304-9.
125. TRUNE DR, KEMPTON JB, MITCHELL CR, HEFENEIDER SH. Failure of elevated heat shock protein 70 antibodies to alter cochlear function in mice. *Hear Res* 1998; 116(1-2):65-70.
126. MAZLUMZADEH M, LOWE VJ, MULLAN BP, FABRY DA, McDONALD TJ, MATTESON EL. The utility of positron emission tomography in the evaluation of autoimmune hearing loss. *Otol Neurotol* 2003; 24(2):201-4.
127. ZEITOUN H, BECKMAN JG, ARTS HA, LANSFORD CD, LEE DS, EL-KASHLAN HK, ET AL. Corticosteroid response and supporting cell antibody in autoimmune hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 131(8):665-72.
128. VELDMAN JE, HANADA T, MEEUWSEN F. Diagnostic and therapeutic dilemmas in rapidly progressive sensorineural hearing loss and sudden deafness. A reappraisal of immune reactivity in inner ear disorders. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1993; 113(3): 303-6.
129. HIROSE K, WENER MH, DUCKERT LG. Utility of laboratory testing in autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope* 1999; 109(11):1749-54.
130. GARCÍA-CALLEJO FJ, MARCO-ALGARRA J, MARTÍNEZ BENEYTO MP, ORTOS ALBORCH MH, MORANT VENTURA A. Autoimmune identification of sudden hearing loss. *Acta Otolaryngol* 2003; 123(2):168-71.

- 131.BROOKES GB. Immune complex-associated deafness: preliminary communication. *J Roy Soc Med* 1985; 78(1):47-55.
- 132.COTTER CS, SINGLETON GT, CORMAN LC. Immune-mediated inner ear disease and parvovirus B19. *Laryngoscope* 1994; 104(10):1235-9.
- 133.LORENZ RR, SOLARES CA, WILLIAMS P, SIKORA J, PELFREY CM, HUGHES GB, ET AL. Interferon-gamma production to inner ear antigens by T cells from patients with autoimmune sensorineural hearing loss. *J Neuroimmunol* 2002; 130(1-2):173-8.
- 134.GARCÍA-BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R, TRINIDAD A. Sordera autoinmunitaria: mejorando el rendimiento de su diagnóstico. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2007; 58(4):138-42.
- 135.GARCÍA-BERROCAL JR, TRINIDAD A, RAMÍREZ-CAMACHO R, LOBO D, VERDAGUER M, IBÁÑEZ A. Immunologic work-up study for inner ear disorders: looking for a rational strategy. *Acta Otolaryngol* 2005; 125(8):814-8.
- 136.LASSO M. “Prevalencia y factores de riesgo asociados a la hipoacusia neurosensorial de altas frecuencias en la artritis reumatoide y en lupus eritematoso sistémico” [Tesis doctoral]. [Madrid]: Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid; 2012. 173 p.
- 137.GARCÍA-BERROCAL JR, GÓRRIZ C, RAMÍREZ-CAMACHO R, TRINIDAD A, IBÁÑEZ A, RODRÍGUEZ-VALIENTE A, ET AL. Otosyphilis mimics immune disorders of the inner ear. *Acta Otolaryngol* 2006; 126(7):679-84.
- 138.FUKUSHIMA K, KASAI N, UEKI Y, NISHIZAKI K, SUGATA K, HIRAKAWA S, ET AL. A gene for fluctuating, progressive autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA16, maps to chromosome 2q23-24.3. *Am J Hum Genet* 1999; 65(1):141-150.
- 139.KASAI N, FUKUSHIMA K, UEKI Y, PRASAD S, NOSAKOWSKI J, SUGATA K, ET AL. Genomic structures of SCN2A and SCN3A-candidate genes for deafness at the DFNA16 locus. *Gene* 2001; 264(1):113-22.
- 140.HAWKINS PN, LACHMANN HJ, AGANNA E, MCDERMOTT MF. Spectrum of clinical features in Muckle-Wells syndrome and response to anakinra. *Arthritis Rheum* 2004; 50(2):607-12.
- 141.NEVEN B, CALLEBAUT I, PRIER AM, FELDMANN J, BODEMER C, LEPORE L, ET AL. Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated

- with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. *Blood* 2004; 103(7):2809-15.
- 142.DODE C, LE DU N, CUISSET L, LETOURNEUR F, BERTHELOT JM, VAUDOUR G, ET AL. New mutations of CIAS1 that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: a novel mutation underlies both syndromes. *Am J Hum Genet* 2002; 70(6):1498-506.
 - 143.KOITSCHEV A, GRAMLICH K, HANSMANN S, BENSELER S, PLONTKE SK, KOITSCHEV C, ET AL. Progressive familial hearing loss in Muckle-Wells syndrome. *Acta Otolaryngol* 2012; 132(7):756-62.
 - 144.BISWAS D, STAFFORD N. Otolaryngological manifestations of “Muckle-Wells syndrome”. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74(5):553-5.
 - 145.GARCÍA-BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R, TRINIDAD A, LOBO D. Glucocorticoids: the best therapy for immune-mediated inner ear disease. *Curr Topics Steroid Res* 2004; 4:99-104.
 - 146.KEMPF HG, HÖRNIG T. Immunologische Befunde und Therapie-ergebnisse bei chronisch-progredienter Innenohrschwerhörigkeit. *HNO* 1987; 35(1):38-42.
 - 147.GARCÍA-BERROCAL JR, IBÁÑEZ A, RODRÍGUEZ A, GONZÁLEZ-GARCÍA JA, VERDAGUER JM, TRINIDAD A, ET AL. Alternatives to systemic steroid therapy for refractory immune-mediated inner ear disease: a physiopathologic approach. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006; 263:977-982.
 - 148.GUYRE PM, GIRARD MT, MORGANELLI PM, MANGANIELLO PD. Glucocorticoid effects on the production and actions of immune cytokines. *J Steroid Biochem* 1988; 30(1-6):89-93.
 - 149.GÖTTLICHER M, HECK S, HERRLICH P. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* 1998; 76(7):480-9.
 - 150.KARIN M, LIU Z, ZANDI E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(2):240-6.
 - 151.KIMBERLY RP. Glucocorticoids. *Curr Opin Rheumatol* 1989; 1(1):92-7.
 - 152.RYAN AF, HARRIS JP, KEITHLEY EM. Immune-mediated hearing loss: basic mechanisms and options for therapy. *Acta Otolaryngol (Suppl)* 2002; 548:38-43.
 - 153.HARRIS JP, WEISMAN MH, DEREBERY JM, ESPELAND MA, GANTZ BJ, GULYA AJ, ET AL. Treatment of corticosteroid-responsive autoimmune inner ear disease

- with methotrexate: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290(14):1875-83.
154. ALEXIOU C, ARNOLD W, FAUSER C, SCHRATZENSTALLER B, GLODDEK B, FUHRMANN S, ET AL. Sudden sensorineural hearing loss: does application of glucocorticoids make sense? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127(3):253-8.
 155. GARCÍA-BERROCAL JR, RAMÍREZ-CAMACHO R, LOBO D, TRINIDAD A, VERDAGUER JM. Adverse effects of glucocorticoid therapy for inner ear disorders. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2008; 70(4):271-4.
 156. CRONSTEIN BN, NAIME D, OSTAD E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an *in vivo* model of inflammation. *J Clin Invest* 1993; 92(6):2675-82.
 157. WHITING-O'KEEFE QE, FYE KH, SACK KD. Methotrexate and histologic hepatic abnormalities: a meta-analysis. *Am J Med* 1991; 90(6):711-6.
 158. MORGAN SL, BAGGOTT JE, VAUGHN WH, AUSTIN JS, VEITCH TA, LEE JY, ET AL. Supplementation with folic acid during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1994; 121:833-41.
 159. LASAK JM, SATALOFF RT, HAWKSHAW M, CAREY TE, LYONS KM, SPIEGEL JR. Autoimmune inner ear disease: steroid and cytotoxic drug therapy. *Ear Nose Throat J* 2001; 80(11):808-11.
 160. SARAÇAYDIN A, KATIRCIOGLU S, KARATAY MC. Azathioprine in combination with steroids in the treatment of autoimmune inner-ear disease. *J Int Med Res* 1993; 21(4):192-6.
 161. BROUGHTON SS, MEYERHOFF WE, COHEN SB. Immune-mediated inner ear disease: 10-year experience. *Semin Arthritis Rheum* 2004; 34(2):544-8.
 162. LUETJE CM, BERLINER KI. Plasmapheresis in autoimmune inner ear disease: long-term follow up. *Am J Otol* 1997; 18(5):572-6.
 163. NIPARKO JK, WANG NY, RAUCH SD, RUSSELL GB, ESPELAND MA, PIERCE JJ, ET AL. Serial audiometry in a clinical trial of AIED treatment. *Otol Neurotol* 2005; 26(5):908-17.
 164. RAUCH SD, COHEN MA, RUCKENSTEIN MJ. Autoimmune inner ear disease. *En Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Richardson MA, Robbins KT,*

- Thomas JR, editores. Cummings otolaryngology head and neck surgery. Elsevier; 2010. p. 2166-7.*
- 165.RIVERA T, SANZ L, CAMARERO G, VARELA-NIETO I. Drug delivery to the inner ear: strategies and their therapeutic implications for sensorineural hearing loss. *Curr Drug Deliv* 2012; 9(3):231-42.
 - 166.GOYCOOLEA MV. Clinical aspects of round window membrane permeability under normal and pathological conditions. *Acta Otolaryngol* 2001; 121(4):437-47.
 - 167.PARNES LS, SUN AH, FREEMAN DJ. Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application. *Laryngoscope* 1999; 109(7Pt2):1-17.
 - 168.CHANDRASEKHAR SS, RUBINSTEIN RY, KWARTLER JA, GATZ M, CONNELLY PE, HUANG E, ET AL. Dexamethasone pharmacokinetics in the inner ear: comparison of route of administration and use of facilitating agents. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122(4):521-8.
 - 169.SHIRWANY NA, SEIDMAN MD, TANG W. Effect of transtympanic injection of steroids on cochlear blood flow, auditory sensitivity, and histology in the guinea pig. *Am J Otol* 1998; 19(2):230-5.
 - 170.CASARES C, RAMÍREZ-CAMACHO R, TRINIDAD A, ROLDÁN A, JORGE E, GARCÍA-BERROCAL JR. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012; 269:2455-9.
 - 171.SILVERSTEIN H, CHOO D, ROSENBERG SI, KUHN, J, SEIDMAN M, STEIN I. Intratympanic steroid treatment of inner ear disease and tinnitus (preliminary report). *Ear Nose Throat J* 1996; 75(8):468-71.
 - 172.BOTSIOS C. Safety of tumor necrosis factor and interleukin-1 blocking agents in rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2005; 4(3):162-70.
 - 173.CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72(9):3666-70.
 - 174.HESS A, BLOCH W, HUVERSTUHL J, SU J, STENNERT E, ADDICKS K, ET AL. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the cochlea of guinea pigs after intratympanical endotoxin-treatment. *Brain Res* 1999; 830(1):113-22.

- 175.HARAOUI B. The anti-tumor necrosis factor agents are a major advance in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 2005; 72:46-7.
- 176.MORELAND LW, COHEN SB, BAUMGARTNER SW, TINDALL EA, BULPITT K, MARTIN R, ET AL. Long-term safety and efficacy of etanercept in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28(6):1238-44.
- 177.RAHMAN MU, POE DS, CHOI HK. Etanercept therapy for immune-mediated cochleovestibular disorders: preliminary results in a pilot study. *Otol Neurotol* 2001; 22(5):619-24.
- 178.MATTESON EL, CHOI HK, POE DS, WISE C, LOWE VJ, McDONALD TJ, ET AL. Etanercept therapy for immune-mediated cochleovestibular disorders: a multi-center, open-label, pilot study. *Arthritis Rheum* 2005; 53(3):337-42.
179. COHEN S, SHOUP A, WEISMAN MH, HARRIS J. Etanercept treatment for autoimmune inner ear disease: results of a pilot placebo-controlled study. *Otol Neurotol* 2005; 26(5):903-7.
- 180.STREET I, JOBANPUTRA P, PROOPS DW. Etanercept, a tumor necrosis factor alpha receptor antagonist, and methotrexate in acute sensorineural hearing loss. *J Laryngol Otol* 2006; 120(12):1064-6.
- 181.U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION [Internet]. FDA Approved Drug Products. [acceso 24 de noviembre de 2012]. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetail>.
- 182.EUROPEAN MEDICINES AGENCY [Internet]. Etanercept [actualizado 24 de agosto de 2012; acceso 24 de noviembre de 2012]. Disponible en: www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?&curl=pages/medicines/human/medicines/000262/human_med_000764.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
- 183.EUROPEAN MEDICINES AGENCY [Internet]. Infliximab [actualizado 21 de marzo de 2012; acceso 24 de noviembre de 2012]. Disponible en: www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?&curl=pages/medicines/human/medicines/000240/human_med_001023.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
- 184.EUROPEAN MEDICINES AGENCY [Internet]. Adalimumab [actualizado 4 de febrero de 2013; acceso 12 de febrero de 2013]. Disponible en: www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?&curl=pages/medicines/human/medicines/000822/human_med_000822.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.

185. EUROPEAN MEDICINES AGENCY [Internet]. Rituximab [actualizado 1 de diciembre de 2010; acceso 24 de Noviembre de 2012]. Disponible en: www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000165/human_med_000897.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
186. EUROPEAN MEDICINES AGENCY [Internet]. Anakinra [actualizado 26 de enero de 2009; acceso 24 de Noviembre de 2012]. Disponible en: www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000363/human_med_000874.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
187. SALVARANI C, PIPITONE N, CATANOSO M, CHIAROLANZA I, BOIARDI L, CARUSO A, ET AL. Adalimumab in psoriatic arthritis. *J Rheumatol Suppl* 2012; 89:77-81.
188. VAN VOLLENHOVEN RF, FLEISCHMANN R, COHEN S, LEE EB, GARCÍA MEIJIDE JA, WAGNER S, ET AL. Tofacitinib or adalimumab versus placebo in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2012; 367(6):508-19.
189. BURMESTER GR, PANACCIONE R, GORDON KB, MCILRAITH MJ, LACERDA AP. Adalimumab: long-term safety in 23 458 patients from global clinical trials in rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, psoriasis and Crohn's disease. *Ann Rheum Dis* 2012. (En prensa).
190. MOROVIC VERGLES J, RADIC M, KOVACIC J, SALAMON L. Successful use of adalimumab for treating rheumatoid arthritis with autoimmune sensorineural hearing loss: two birds with one stone. *J Rheumatol* 2010; 37:1080-1.
191. GHADBAN R, COURET M, ZENOTE T. Efficacy of infliximab in Cogan's syndrome [letter]. *J Rheumatol* 2008; 35(12):2456-8.
192. SIDDIQUI MA, SCOTT LJ. Infliximab: a review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis. *Drugs* 2005; 65(15):2179-208.
193. VAN WIJK F, STAECKER H, KEITHLEY E, LEFEBVRE PP. Local perfusion of the tumor necrosis factor alpha blocker infliximab to the inner ear improves autoimmune neurosensory hearing loss. *Audiol Neurotol* 2006; 11(6):357-65.
194. DINARELLO CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005; 201(9): 1355-9.
195. ZAJA F, IACONA I, MASOLINI P, RUSSO D, SPEROTTO A, PROSDOCIMO S, ET AL. B-cell depletion with rituximab as treatment for immune hemolytic anemia and chronic thrombocytopenia. *Haematologica* 2002; 87(2):189-95. Erratum in *Haematologica* 2002; 87(3):336.

196. KEYSTONE E, FLEISCHMANN R, EMERY P, FURST DE, VAN VOLLENHOVEN R, BATHON J, ET AL. Safety and efficacy of additional courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: an open-label extension analysis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(12):3896-908.
197. COHEN S, ROLAND P, SHOUP A, LOWENSTEIN M, SILVERSTEIN H, KAVANAUGH A, ET AL. A pilot study of rituximab in immune-mediated inner ear disease. *Audiol Neurotol* 2011; 16(4):214-21.
198. ORSONI JG, LAGANÀ B, RUBINO P, ZAVOTA L, BACCIU S, MORA P. Rituximab ameliorated severe hearing loss in Cogan's syndrome: a case report. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5:18.
199. GUHL G, DÍAZ-LEY B, FERNÁNDEZ-HERRERA J. Uso de fármacos biológicos en dermatosis fuera de la indicación aprobada. Segunda parte: etanercept, efalizumab, alefacept, rituximab, daclizumab, basiliximab, omalizumab y cetuximab. *Actas Dermatosifiliogr* 2008; 99(1):5-33.
200. VAN ZUTPHEN LFM, BAUMANS V, BEYNEN AC. Principios de la ciencia del Animal de Laboratorio. 1st ed. Granada: SECAL; 1999 (Edición publicada con el permiso de Elsevier). p 1-402.
201. CARBONE L. Pain management standards in the eighth edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012; 51(3):322-8.
202. NEWCOMER CE. The evolution and adoption of standards used by AAALAC. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012; 51(3):293-7.
203. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th edition. Washington: National Academies Press (US); 2011.
204. HAWKINS P, MORTON DB, BURMAN O, DENNISON N, HONESS P, JENNINGS M, ET AL. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim* 2011; 45(1):1-13.
205. MEDINA LV, HRAPKIEWICZ K, TEAR M, ANDERSON LC. Fundamental training for individuals involved in the care and use of laboratory animals: a review and update of the 1991 NRC Core Training Module. *ILAR J* 2007; 48(2):96-108.

- 206.MÉNDEZ-BENEGASSI I, TRINIDAD A, GARCÍA-BERROCAL JR, MARTÍN C, MARTÍNEZ-MONEDERO R, VERDAGUER JM, ET AL. Estudio ultraestructural de la porción lateral del órgano sensorial auditivo mediante un método sin descalcificación. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2008; 59(8):377-83.
- 207.SCHERER EQ, YANG J, CANIS M, REIMANN K, IVANOV K, DIEHL CD, ET AL. Tumor necrosis factor- α enhances microvascular tone and reduces blood flow in the cochlea via enhanced sphingosine-1-phosphate signaling. *Stroke* 2010; 41(11):2618-24.
- 208.LIU YC, RUBIN R, SATALOFF RT. Treatment-refractory autoimmune sensorineural hearing loss: response to infliximab. *Ear Nose Throat J* 2011; 90(1):23-8.
- 209.STAECKER H, LEFEBVRE PP. Autoimmune sensorineural hearing loss improved by tumor necrosis factor-alpha blockade: a case report. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(6):684-7.
- 210.SCHERER MP, GUMMER AW. Vibration pattern of the organ of Corti up to 50 KHz: evidence for resonant electromechanical force. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(51):17652-7.
- 211.YANG GS, SONG HT, KEITHLEY EM, HARRIS JP. Intratympanic immunosuppressives for prevention of immune-mediated sensorineural hearing loss. *Am J Otol* 2000; 21(4):499-504.
- 212.DI PIERRO F, D'ATRI G, MARCUCCI F, LEONI F. Use of type I and type IV hypersensitivity responses to define the immunopharmacological profile of drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997; 37(2):91-6.
- 213.NARIUCHI H, SONE M, TAGO C, KURATA T, SAITO K. Mechanisms of hearing disturbance in an autoimmune model mouse NZB/kI. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 1994; 514:127-31.
- 214.LIN DW, TRUNE DR. Breakdown of stria vascularis blood-labyrinth barrier in C3H/lpr autoimmune disease mice. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 117(5):530-4.
- 215.HARRIS JP, WOOLF NK, RYAN AF. A reexamination of experimental type II collagen autoimmunity: middle and inner ear morphology and function. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1986; 95(2 Pt 1):176-80.
- 216.SOLIMAN AM. Type II collagen-induced inner ear disease: critical evaluation of the guinea pig model. *Am J Otol* 1990; 11(1):27-32.

217. ASARCH R, ABRAMSON M, LITTON WB. Surgical anatomy of the guinea pig ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1975; 84(2 Pt 1):250-5.
218. SEHITOGLU MA, UNERI C, CELIKOYAR MM, UNERI A. Surgical anatomy of the guinea pig middle ear. *Ear Nose Throat J* 1990; 69(2):91-7.
219. PÉREZ HERNÁNDEZ N. “Anatomía del hueso temporal y oído del cobaya (*Cavia cobaya*). Bases de la experimentación otológica” [Tesis doctoral]. [Navarra]: Universidad de Navarra; 1997. 308 p.
220. BOUMAN H, KLIS SF, MEEUWSEN F, DE GROOT JC, SMOORENBURG GF, VELDMAN JE. Experimental autoimmune inner ear disease: an electrocochleographic and histophysiologic study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109(5):457-66.
221. ROSS UH, ROGOWSKI M, REISS G, GLODDEK B. Detection of cochlear dysfunction by the measurement of transiently evoked otoacoustic emissions in guinea pigs with autoimmune-induced labyrinthitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994; 251(2):80-3.
222. GONG SS, YAN Z. Expression of heat shock protein 70 in the cochlea in experimental autoimmune inner ear disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111(3 Pt 1):275-80.
223. LOBO D, TRINIDAD A, GARCÍA-BERROCAL JR, VERDAGUER JM, RAMÍREZ-CAMACHO R. TNFalpha blockers do not improve the hearing recovery obtained with glucocorticoid therapy in an autoimmune experimental labyrinthitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006; 263(7):622-6.
224. WANG X, TRUONG T, BILLINGS PB, HARRIS JP, KEITHLEY FM. Blockage of immune-mediated inner ear damage by etanercept. *Otol Neurotol* 2003; 24(1): 52-7.
225. BRAUN S, YE Q, RADELOFF A, KIEFER J, GSTOETTNER W, TILLEN J. Protection of inner ear function after cochlear implantation: compound action potential measurements after local application of glucocorticoids in the guinea pig cochlea. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2011; 73(4):219-28.
226. SOUTER M, EASTWOOD H, MAROVIC P, KEL G, WONGPRASARTSUK S, RYAN AF, ET AL. Systemic immunity influences hearing preservation in cochlear implantation. *Otol Neurotol* 2012; 33(4):532-8.

- 227.CARVALHO GJ, LALWANI AK. The effect of cochleostomy and intracochlear infusion on auditory brain stem response threshold in the guinea pig. *Am J Otol* 1999; 20(1):87-90.
- 228.BALKANY T, HODGES AV, WHITEHEAD M, MEMARI F, MARTIN GK. Cochlear endoscopy with preservation of hearing in guinea pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111(4):439-45.
- 229.SMOUHA EE, NAMDAR I, MICHAELIDES EM. Partial labyrinthectomy with hearing preservation: an experimental study in guinea pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 114(6): 777-84.
- 230.LI X, MAO XB, HEI RY, ZHANG ZB, WEN LT, ZHANG PZ, ET AL. Protective role of hydrogen sulfide against noise-induced cochlear damage: a chronic intracochlear infusion model. *PLoS One* 2011; 6(10):e26728. doi:10.1371/0026728.
- 231.BRUCE IA, BATES JE, MELLING C, MAWMAN D, GREEN KM. Hearing preservation via a cochleostomy approach and deep insertion of a standard lenght cochlear implant electrode. *Otol Neurotol* 2011; 32(9):1444-7.
- 232.KANG SY, COLESA DJ, SWIDERSKI DL, SU GL, RAPHAEL Y, PFINGST BE. Effects of hearing preservation on psychophysical responses to cochlear implant stimulation. *J Assoc Res Otolaryngol* 2010; 11(2):245-65.
- 233.LEHNHARDT E. Intracochlear placement of cochlear implant electrodes in a soft surgery technique. *HNO* 1993; 41(7):356-9.
- 234.JAMES C, ALBEGGER K, BATTMER R, BURDO S, DEGGOUJ N, DEGUINE O, ET AL. Preservation of residual hearing with cochlear implantation: how and why. *Acta Otolaryngol* 2005; 125(5):481-91.
- 235.PAU HW, JUST T, LEHNHARDT E, HESSEL H, BEHREND D. An “endosteal electrode” for cochlear implantation in cases with residual hearing? Feasibility study: preliminary temporal bone experiments. *Otol Neurotol* 2005; 26(3):448-54.
- 236.KIEFER J, GSTOETTNER W, BAUMGARTNER W, POK SM, TILLEIN J, YE Q, ET AL. Conservation of low-frequency hearing in cochlear implantation. *Acta Otolaryngol* 2004; 124(3):272-80.
- 237.LENARZ T, STÖVER T, BUECHNER A, LESINSKI-SCHIEDAT A, PATRICK J, PESCH J. Hearing conservation surgery using the Hybrid-L electrode. Results from the

- first clinical trial at the Medical University of Hannover. *Audiol Neurotol* 2009; 14 (Suppl1):22-31.
- 238.GSTOETTNER WK, VAN DE HEYNING P, O'CONNOR AF, MORERA C, SAINZ M, VERMEIRE K, ET AL. Electric acoustic stimulation of the auditory system: results of a multi-centre investigation. *Acta Otolaryngol* 2008; 128(9):968-75.
 - 239.TURNER CW, REISS LA, GANTZ BJ. Combined acoustic and electric hearing: preserving residual acoustic hearing. *Hear Res* 2008; 242(1-2):164-71.
 - 240.BORENSTEIN JT. Intracochlear drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 2011; 8(9):1161-74.
 - 241.PAASCHE G, GIBSON P, AVERBECK T, BECKER H, LENARZ T, STÖVER T. Technical report: modification of a cochlear implant electrode for drug delivery to the inner ear. *Otol Neurotol* 2003; 24(2):222-7.
 - 242.RICHARDSON RT, WISE AK, THOMPSON BC, FLYNN BO, ATKINSON PJ, FRETWELL NJ, ET AL. Polypyrrole-coated electrodes for the delivery of charge and neurotrophins to cochlear neurons. *Biomaterials* 2009; 30(13):2614-24.
 - 243.STAECKER H, JOLLY C, GARNHAM C. Cochlear implantation: an opportunity for drug development. *Drug Discov Today* 2010; 15(7-8):314-21.
 - 244.SHEPHERD RK, XU J. A multichannel scala tympani electrode array incorporating a drug delivery system for chronic intracochlear infusion. *Hear Res* 2002; 172(1-2):92-8.
 - 245.BORKHOLDER DA, ZHU X, HYATT BT, ARCHILLA AS, LIVINGSTON WJ 3RD, FRISINA RD. Murine intracochlear drug delivery: reducing concentration gradients within the cochlea. *Hear Res* 2010; 268(1-2):2-11.
 - 246.PLONTKE SK, SIEDOW N, WEGENER R, ZENNER HP, SALT AN. Cochlear pharmacokinetics with local inner ear drug delivery using a three-dimensional finite-element computer model. *Audiol Neurotol* 2007; 12(1):37-48.
 - 247.CHEN Z, KUJAWA SG, MCKENNA MJ, FIERING JO, MESCHER MJ, BORENSTEIN JT, ET AL. Inner ear drug delivery via a reciprocating perfusion system in the guinea pig. *J Control Release* 2005; 110(1):1-19.
 - 248.SEWELL WF, BORENSTEIN JT, CHEN Z, FIERING J, HANDZEL O, HOLMBOE M, ET AL. Development of a microfluidics-based intracochlear drug delivery device. *Audiol Neurotol* 2009; 14(6):411-22.

- 249.KORVER KD, RYBAK LP, WHITWORTH C, CAMPBELL KM. Round window application of D-methionine provides complete cisplatin otoprotection. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 126(6):683-9.
- 250.KAUR T, MUKHERJEA D, SHEEHAN K, JAJOO S, RYBAK LP, RAMKUMAR V. Short interfering RNA against STAT1 attenuates cisplatin-induced ototoxicity in the rat by suppressing inflammation. *Cell Death Dis* 2011; 2:e180.doi: 10.1038/cddis.2011.63.
- 251.MUKHERJEA D, JAJOO S, WHITWORTH C, BUNCH JR, TURNER JG, RYBAK LP, ET AL. Short interfering RNA against transient receptor potential vanilloid-1 attenuates cisplatin-induced hearing loss in the rat. *J Neurosci* 2008; 28(49): 13056-65.
- 252.DIMITROV EA, DUCKERT LG. Morphologic changes in the guinea pig cochlea following cochleostomy- a preliminary scanning electron microscope study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1985; 93(3):408-13.
- 253.RAMÍREZ-CAMACHO R, GARCÍA-BERROCAL JR, TRINIDAD A, VERDAGUER JM, NEVADO J. Blebs in inner and outer hair cells: a pathophysiological hypothesis. *J Laryngol Otol* 2008; 122(11):1151-5.
- 254.ROSEN A, CASCIOLA-ROSEN L. Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death Differ* 1999; 6(1):6-12.
- 255.HALL JC, CASCIOLA-ROSEN L, ROSEN A. Altered structure of autoantigens during apoptosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30(3):455-71.
- 256.EL-HENNAWI DM, EL-DEEN MH, ABOU-HALAWA AS, NADEEM HS, AHMED MR. Efficacy of intratympanic methylprednisolone acetate in treatment of drill-induced sensorineural hearing loss in guinea pigs. *J Laryngol Otol* 2005; 119(1):2-7.
- 257.ENGSTRÖM B. Stereocilia of sensory cells in normal and hearing impaired ears. A morphological, physiological and behavioral study. *Scand Audiol Suppl* 1983; 19:1-34.
- 258.OSBORNE MP, COMIS SD, JOHNSON AP, JEFFRIES DR. Post-mortem changes in hair bundles of the guinea pig and human cochlea studied by high-resolution scanning microscopy. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1989; 108(3-4):217-26.

- 259.COMIS SD, OSBORNE MP, O'CONNELL J, JOHNSON AP. The importance of early fixation in preservation of human cochlear and vestibular sensory hair bundles. *Acta Otolaryngol* 1990; 109(5-6):361-8.
- 260.RUCKENSTEIN MJ, KEITHLEY EM, BENNETT T, POWELL HC, BAIRD S, HARRIS JP. Ultrastructural pathology in the stria vascularis of the MRL-FasI (lpr) mouse. *Hear Res* 1999; 131(1-2):22-8.
- 261.RUCKENSTEIN MJ, SARWAR A, HU L, SHAMI H, MARION TN. Effects of immunosuppression on the development of cochlear disease in the MRL-Fas(lpr) mouse. *Laryngoscope* 1999; 109(4):626-30.
- 262.TRUNE DR, WOBIG RJ, KEMPTON JB, HEFENEIDER SH. Steroid treatment in young MRL.MpJ-Fas(lpr) autoimmune mice prevents cochlear dysfunction. *Hear Res* 1999; 137(1-2):167-73.
- 263.TRUNE DR, KEMPTON JB, KESSI M. Aldosterone (mineralocorticoid) equivalent to prednisolone (glucocorticoid) in reversing hearing loss in MRL/MpJ-FasIpr autoimmune mice. *Laryngoscope* 2000; 110(11):1902-6.
- 264.TRUNE DR, KEMPTON JB, GROSS ND. Mineralocorticoid receptor mediates glucocorticoid treatment effects in the autoimmune mouse ear. *Hear Res* 2006; 212(1-2):22-32.
- 265.SUDO N, YOO TJ. Effect of anti-inflammatory drugs on collagen-induced autoimmune inner ear disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988; 97(2 Pt 1):153-8.
- 266.GARCÍA-BERROCAL JR, VICENTE J, ARELLANO B, GONZÁLEZ F, RAMÍREZ-CAMACHO R. Laberintitis experimental autoimmune: evaluación de diversos modelos en cobayas. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1997; 48(1):5-10.
- 267.LÓPEZ-GONZÁLEZ MA, LUCAS M, SÁNCHEZ B, WICHMANN I, GARCÍA-MONGE E, NÚÑEZ-ROLDÁN A, ET AL. Autoimmune deafness is not related to hyperreactivity to type II collagen. *Acta Otolaryngol* 1999; 119(6):690-4.
- 268.SIAUD P, MAUREL D, LUCCIANO M, KOSA E, CAZALS Y. Enhanced cochlear acoustic sensitivity and susceptibility to endotoxin are induced by adrenalectomy and reversed by corticosterone supplementation in rat. *Eur J Neurosci* 2006; 24(12):3365-71.
- 269.RAREY KE, CURTIS LM. Receptors for glucocorticoids in the human inner ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 115(1):38-41.

- 270.CROXTALL JD, GILROY DW, SOLITO E, CHOUDHURY Q, WARD BJ, BUCKINGHAM JC, ET AL. Attenuation of glucocorticoid functions in an Anx-A1-/- cell line. *Biochem J* 2003; 371(Pt 3):927-35.
- 271.HAAKE SM, DINH CT, CHEN S, ESHRAGHI AA, VAN DE WATER TR. Dexamethasone protects auditory hair cells against TNFalpha-initiated apoptosis via activation of PI3K/Akt and NFkappaB signaling. *Hear Res* 2009; 255(1-2):22-32.
- 272.TISCHNER D, REICHARDT HM. Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 275(1-2):62-70.
- 273.MATTSON MP. NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem Res* 2005; 30(6-7):883-93.
- 274.YAMAMOTO H, OMELCHENKO I, SHI X, NUTTALL AL. The influence of NF-kappaB signal-transduction pathways on the murine inner ear by acoustic overstimulation. *J Neurosci Res* 2009; 87(8):1832-40.
- 275.SO H, KIM H, LEE JH, PARK C, KIM Y, KIM E, ET AL. Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF-kB. *J Assoc Res Otolaryngol* 2007; 8:338-55.
- 276.LANG H, SCHULTE BA, ZHOU D, SMYTHE N, SPICER SS, SCMIEDT RA. Nuclear factor kappaB deficiency is associated with auditory nerve degeneration and increase noise-induced hearing loss. *J Neurosci* 2006; 26(13):3541-50.
- 277.JIANG H, SHA SH, SCHACHT J. NF-kappaB pathway protects cochlear hair cells from aminoglycoside-induced ototoxicity. *J Neurosci Res* 2005; 79(5):644-51.
- 278.NAGY I, MONGE A, ALBINGER-HEGYI A, SCHMID S, BODMER D. NF-kappaB is required for survival of immature auditory hair cells in vitro. *J Assoc Res Otolaryngol* 2005; 6(3):260-8.
- 279.KHAN M, SZCZEPEK AJ, HAUPT H, OLZE H, MAZUREK B. Expression of the proinflammatory cytokines in cochlear explant cultures: influence of normoxia and hypoxia. *Neurosci Lett* 2010; 479(3):249-52.
- 280.ZOU J, PYYKKÖ I, SUTINEN P, TOPPILA E. Vibration induced hearing loss in guinea pig cochlea: expression of TNF-alpha and VEGF. *Hear Res* 2005; 202(1-2):13-20.
- 281.FUJIOKA M, KANZAKI S, OKANO HJ, MASUDA M, OGAWA K, OKANO H. Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. *J Neurosci Res* 2006; 83(4):575-83.

282. AMINPOUR S, TINLING SP, BRODIE HA. Role of tumor necrosis factor-alpha in sensorineural hearing loss after bacterial meningitis. *Otol Neurotol* 2005; 26(4):602-9.
283. VAN DE WATER TR, LALLEMEND F, ESHRAGHI AA, ASHAN S, HE J, GUZMAN J, ET AL. Caspases, the enemy within, and their role in oxidative stress-induced apoptosis of inner ear sensory cells. *Otol Neurotol* 2004; 25(4):627-32.
284. GARG AK, AGGARWAL BB. Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol Immunol* 2002; 39(9):509-17.
285. MALGRANGE B, RIGO JM, COUCKE P, THIRY M, HANS G, NGUYEN L, ET AL. Identification of factors that maintain mammalian outer hair cells in adult organ of Corti explants. *Hear Res* 2002; 170(1-2):48-58.
286. SHA SH, TAYLOR R, FORGE A, SCHACHT J. Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. *Hear Res* 2001; 155(1-2):1-8.
287. DINH CT, BAS E, CHAN SS, DINH JN, VU L, VAN DE WATER TR. Dexamethasone treatment of tumor necrosis factor-alpha challenged organ of Corti explants activates nuclear factor kappa B signaling that induces changes in gene expression that favor hair cell survival. *Neuroscience* 2011; 188:157-67.
288. DINH CT, HAAKE S, CHEN S, HOANG K, NONG E, ESHRAGHI AA, ET AL. Dexamethasone protects organ of Corti explants against tumor necrosis factor-alpha-induced loss of auditory hair cells and alters the expression levels of apoptosis-related genes. *Neuroscience* 2008; 157(2):405-13.
289. TANG G, MINEMOTO Y, DIBLING B, PURCELL NH, LI Z, KARIN M, ET AL. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* 2001; 414(6861):313-7.
290. ADAMS JC. Clinical implications of inflammatory cytokines in the cochlea: a technical note. *Otol Neurotol* 2002; 23(3):316-22.
291. PATHAK S, GOLDOFSKY E, VIVAS EX, BONAGURA VR, VAMBUTAS A. Il-1 β is overexpressed and aberrantly regulated in corticosteroid nonresponders with autoimmune inner ear disease. *J Immunol* 2011; 186(3):1870-9.
292. SINHA PK, PITOVSKI DZ. [3H]-aldosterone binding sites (type I receptors) in the lateral wall of the cochlea: distribution assessment by quantitative autoradiography. *Acta Otolaryngol* 1995; 115(5):643-7.

293. RAMÍREZ-CAMACHO R, GARCÍA-BERROCAL JR, TRINIDAD A, GONZÁLEZ-GARCÍA JA, VERDAGUER JM, IBÁÑEZ A, ET AL. Central role of supporting cells in cochlear homeostasis and pathology. *Med Hypotheses* 2006; 67(3):550-5.
294. SINGH J, WELL G, CHRISTENSEN R, TANJONG GHOGOMU E, MAXWELL L, MACDONALD J, ET AL. Efectos adversos de los productos biológicos: un metanálisis de redes y resumen Cochrane. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 16(2): CD008794. doi: 10.1002/14651858.CD008794.
295. AALTONEN KJ, VIRKKI LM, MALMIVAARA A, KONTTINEN YT, NORDSTRÖM DC, BLOM M. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of existing TNF blocking agents in treatment of rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2012; 7(1): e30275. doi: 10.1371/0030275.
296. LOBO D, GARCÍA-BERROCAL JR, TRINIDAD A, VERDAGUER JM, RAMÍREZ-CAMACHO R. Revisión de las terapias biológicas en la enfermedad inmunomediada del oído interno. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2012. (En prensa). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otorri.2012.04.008>.
297. AGANNA E, MARTINON F, HAWKINS PN, ROSS JB, SWAN DC, BOOTH DR, ET AL. Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(9):2445-52.
298. ZHOU Y, YUAN J, ZHOU B, LEE AJ, LEE AJ, GAWJI M JR, ET AL. The therapeutic efficacy of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on experimental autoimmune hearing loss in mice. *Immunology* 2011; 133(1):133-40.
299. ADLER HJ, RAPHAEL Y. New hair cells arise from supporting cell conversion in the acoustically damaged chick inner ear. *Neurosci Lett* 1996; 205(1):17-20.
300. BRIGANDE JV, HELLER S. Quo vadis, hair cell regeneration? *Nat Neurosci* 2009; 12(6):679-85.
301. KESSER BW, HASHISAKI GT, HOLT JR. Gene transfer in human vestibular epithelia and the prospects for inner ear gene therapy. *Laryngoscope* 2008; 118(5):821-31.
302. KESSER BW, HASHISAKI GT, FLETCHER K, EPPARD H, HOLT JR. An *in vitro* model system to study gene therapy in the human inner ear. *Gene Ther* 2007; 14(15):1121-31.

- 303.SUGAHARA K, SHIMOGORI H, OKUDA T, TAKEMOTO T, YAMASHITA H. Novel method for homogeneous gene transfer to the inner ear. *Acta Otolaryngol Suppl* 2004; 553:19-22.
- 304.LÖWENHEIM H, FURNESS DN, KIL J, ZINN C, GÜLTIG K, FERO ML, ET AL. Gene disruption of p27(Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of Corti. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(7):4084-8.
- 305.BEISEL K, HANSEN L, SOUKUP G, FRITZSCH B. Regenerating cochlear hair cells: quo vadis stem cell. *Cell Tissue Res* 2008; 333(3):373-9.

VIII ANEXOS

ANEXO I

David Lobo · Almudena Trinidad
José Ramón García-Berrocal
Jose María Verdaguer
Rafael Ramírez-Camacho

TNF α blockers do not improve the hearing recovery obtained with glucocorticoid therapy in an autoimmune experimental labyrinthitis

Received: 29 June 2005 / Accepted: 25 October 2005
© Springer-Verlag 2006

Abstract The effectiveness of etanercept [tumour necrosis factor- α (TNF α) blocker] and corticoids in treating immuno-mediated inner ear disease (IMIED) was compared in an animal model of autoimmune labyrinthitis. IMIED is one of the few forms of sensorineural hearing loss that is reversible with proper medical treatment. While the effectiveness and usefulness of immunomodulating agents (corticosteroids) in treating IMIED have been demonstrated, TNF α antagonists, which inhibit granuloma formation in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases, have been considered as an alternative therapy. The efficacy of etanercept (anti-TNF α) was evaluated in a guinea pig model of experimental autoimmune labyrinthitis in which 25 guinea pigs were divided in a control group, which was used to document the rise in hearing thresholds following immunisation, and two experimental groups, which were treated with steroids (6-methylprednisolone) and anti-TNF α (etanercept), respectively, after the immunisation. Comparison of the auditory thresholds obtained by means of auditory brainstem response (ABR) revealed that the auditory thresholds of the two experimental groups were not statistically different (6-methylprednisolone: 41.5 dB, SD: 8.51; etanercept: 37.5 dB, SD: 7.91) and that both compared favourably with that of the control group (60 dB, SD: 7.91) at $p=0.001$. We therefore conclude that etanercept is as effective as glucocorticoids in an animal model of autoimmune labyrinthitis; however, the potential adverse effects and high price of the former advise against its use as an initial therapy for IMIED.

Keywords Etanercept · Experimental labyrinthitis · Guinea pig · Hearing loss · 6-Methylprednisolone

Introduction

The existence of immunological reactions in the inner ear that are responsible for a certain number of cochleovestibular dysfunctions represents one of the few pathological manifestations in which an early pharmacological therapy can reverse auditory loss and balance disorders.

The diagnosis of autoimmune hearing loss was first described by McCabe in 1979 [18], who defined the disorder on the basis of a specific clinical pattern and a positive response to dexametasone and ciclophosphamide therapy. Since it is not possible to correlate the clinical response with the histopathological findings in the temporal bone of patients with this disease, diverse experimental models of autoimmune labyrinthitis have been developed as a means of analysing the effects of immunomodulating therapy on the inner ear. Although numerous immunomodulating drugs have been used for treating immuno-mediated inner ear disease (IMIED), none have been more effective than the glucocorticoids [4, 8]. However, the increase in the number of side effects in long-term treatments is leading researchers to search for drug release devices that can be used in localised therapy [15].

New drugs with modulating effects on the immune system, such as tumour necrosis factor- α (TNF α) blockers, have recently been evaluated [23, 25]. TNF α blockers significantly reduce the cellular inflammatory response and – presumably – modulate altered apoptotic mechanisms [16]. Their application may enable the doses of glucocorticoids to be reduced, which would diminish the adverse effects of the latter and improve the modulation of the immune response. The investigation reported here was carried out to evaluate the efficacy of

D. Lobo · A. Trinidad · J. R. García-Berrocal
J. M. Verdaguer · R. Ramírez-Camacho (✉)
Ear Research Group, Department of Otorhinolaryngology,
Hospital Universitario Puerta de Hierro,
Universidad Autónoma de Madrid,
San Martín de Porres 4, 28035, Madrid, Spain
E-mail: rramirez@seorl.net
Tel.: +34-913162240
Fax: +34-913162240

etanercept (anti-TNF α) relative to that of 6-methylprednisolone in preventing or reversing sensorineural hearing loss in a guinea pig model of experimental autoimmune labyrinthitis.

Materials and methods

Twenty-five female albino Dunkin-Hartley guinea pigs weighing between 350 and 600 g were used. Their care was in accordance with the National Council for the Care of Laboratory Animals guidelines, and institutional review board approval was obtained prior to the study. The animals had normal otoscopic findings and a preserved Preyer's reflex. They were randomly divided into a control group of five animals and two study groups of ten animals each. The control group was used to document the elevation in auditory brain stem response (ABR) thresholds following immunisation with keyhole limpet hemocyanin (KLH).

Experimental design

All animals were sensitised subcutaneously with 0.2 ml of complete Freund's adjuvant (CFA) in 0.2 ml of phosphate buffered saline (PBS) and boosted 2 weeks later with 0.2 ml of incomplete Freund's adjuvant (IFA) in 0.2 ml of PBS. After 1 week 25 μ l of KLH was perfused inside the right cochlea through a small orifice in the scala tympani of the basal cochlear turn [5] using a surgical microscope (model OPMI 2; Zeiss, Germany). Control group animals ($n=5$) did not receive any treatment thereafter.

The animals in the first experimental group ($n=10$) received two doses of 6-methylprednisolone (1 mg/kg) 30 min before the cochlear perfusion and 3 days after it. The animals in the second experimental group ($n=10$) were treated intraperitoneally with 2.5 mg etanercept 30 min before the cochlear perfusion and 3 days after it. This time scheme was adhered to in order to modulate the systemic immune response (administration before the cochlear immunisation) and the local immune response (3 days following the cochlear immunisation). Etanercept was not administered in combination with 6-methylprednisolone in order to avoid a strong immunosuppression that could compromise the survival of the animals.

All procedures were carried out under general anaesthesia using inhalatory isoflurane (Forane; Abbot Laboratories, Abbot Park, Ill.) supported with electrocardiographic monitoring. Intraoperative analgesia was obtained with a subcutaneous injection of 2 mg/kg morphine hydrochlorate and 0.2 mcg/kg meloxicam. A Draeger SA-2 anaesthetic apparatus was used (Draeger, Medizintechnik, Germany), and the body temperature of the animal was monitored with a rectal probe (model Vitara PM 8060; Draeger).

Auditory threshold determination

An ABR test was performed for both ears of each animal at every step of the experiment. The sound stimulus consisted of 10-ms tone bursts, with a rise-fall time of 1 ms at a frequency of 8 kHz, generated by a Medelec Synergy Generator (Oxford Instruments, Oxford, UK). The hearing threshold was defined as the lowest intensity of stimulation that yielded a recognisable V wave, and these were obtained before the sensitisation and 1 week after the cochlear perfusion with KLH. Animals were checked for middle ear effusion before and after their hearing was tested. For this procedure, anaesthesia was induced by intraperitoneal injection of diazepam (5–10 mg/kg), atropin (0.2 mg/kg) and ketamine (30–40 mg/kg).

Statistical analysis

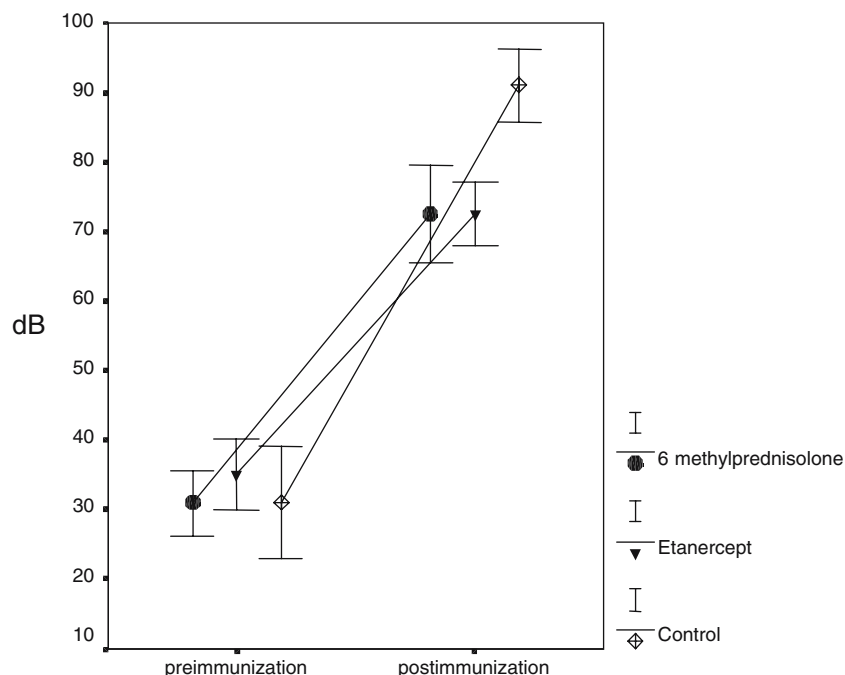
The Student's *t*-test for paired samples was used within each treatment, and ANOVA (analysis of variance) and the Tukey test for multiple group comparison tests were applied among the three groups. The results were expressed as means \pm standard deviation (SD) and the mean of sample differences with 95% confidence intervals (95%CI). The Shapiro-Wilk test was used to confirm the normal distribution hypothesis.

All *p* values were two-sided, and values of 0.05 or less were considered to indicate statistical significance. The statistical tests were performed using spss v.10.0 software (SPSS, Chicago, Ill.).

Results

On the basis of a positive Preyer's reflex and a repeatable ABR response, all animals were judged capable of hearing following surgery. The right ears of all animals, however, showed statistically significant threshold shifts from preoperative values in the mid-frequencies (8 kHz). The mean hearing loss in animals that received 6-methylprednisolone after KLH inner ear challenge was 41.5 dB (SD: 8.51). This was a significantly lower loss ($p=0.001$) than that shown by animals in the untreated group, in which there was a mean loss of 60 dB (SD: 7.91). The mean hearing loss of the animals with KLH-induced labyrinthitis treated with etanercept, 37.5 dB (SD: 7.91), was also significantly lower than that of the control animals ($p<0.001$). We found that the threshold shifts between the group of animals treated with 6-methylprednisolone and etanercept were not different ($p=0.51$) (Fig. 1). These results also demonstrate the preservation of preoperative ABR thresholds in the left ear of all groups. The surgical trauma following cochlear immunisation was responsible for a hearing loss of between 15 and 20 dB.

Fig. 1 Main threshold shifts obtained by auditory brainstem-evoked response (ABR) in the right ear. The mean hearing loss for the animals that did not receive any treatment (*open diamond*; control group) was 60 dB, whereas the mean hearing loss in the animals that received 6-methylprednisolone (*filled circle*) was 41.5 dB ($p=0.001$) and in those that received etanercept (*inverted filled triangle*), 37.5 dB ($p>0.001$)

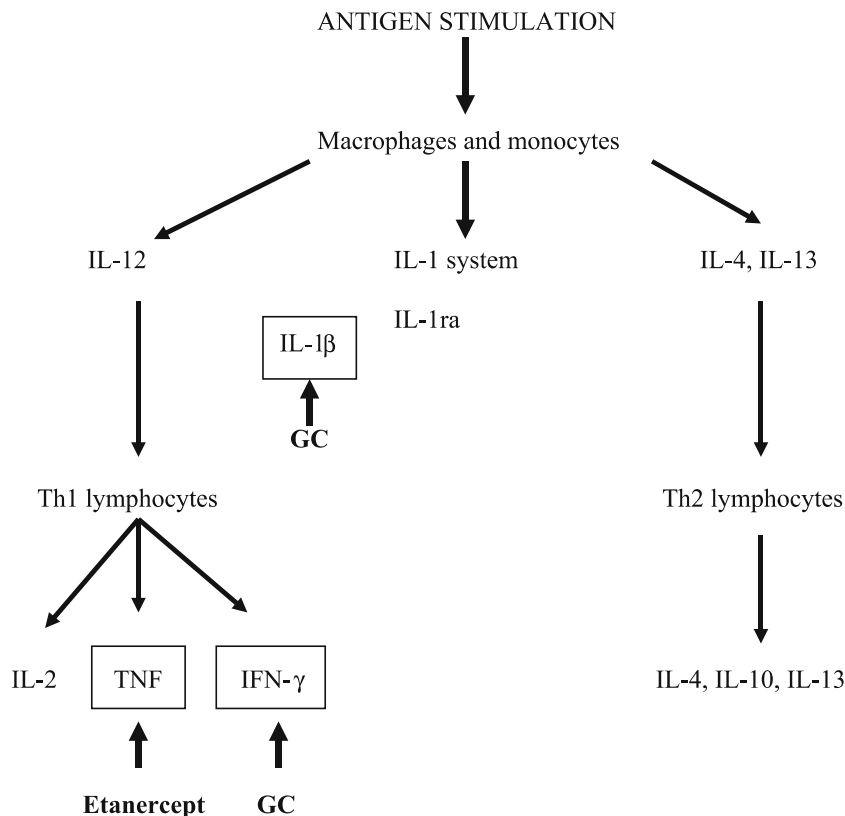


Discussion

Certain types of immuno-mediated deafness can be reversed following immunosuppressive therapy. Glucocorticoids are potent anti-inflammatories and are frequently associated with immediate clinical responses.

They exert their effect by suppressing the immuno-mediated inflammatory response through inhibition of the interleukin system (Fig. 2). The use of corticosteroid therapy has been justified on the basis of the presence of high levels of glucocorticoids in the stria vascularis, spiral ligament and the supporting cells of the organ of Corti. Nevertheless, the long-term administration of

Fig. 2 Effects of glucocorticoids (GC) and etanercept on the inflammatory cascade. *TNF* Tumour necrosis factor, *IL-1* interleukin 1, *IL-1ra* interleukin 1 receptor



these drugs has been linked to severe adverse effects (gastric ulcer, diabetes mellitus, cataract, aseptic osteonecrosis of the femoral or humeral head, among others) [10]. Since autoimmune diseases present a long clinical course with possible exacerbations, other families of immunomodulating drugs, such as methotrexate, are being used to replace the glucocorticoids in attempts to minimise the undesirable effects; however, very different effects are obtained with these alternative drugs [13].

TNF antagonists have been proven to be useful additions to the armamentarium of agents used to manage patients with inflammatory disorders [11]. Etanercept is a soluble TNF-receptor fusion protein which inhibits TNF activity by competitively binding to it and preventing interactions with its cell surface receptors. It is a potent and selective inhibitor of the inflammatory cascade (Fig. 2). Elevated levels of TNF are expressed in the cochlea by infiltrated cells shortly after KLH injection into the inner ear or subarachnoid space [21]. Excessive TNF production has downstream effects on various cell types, such as the macrophages, keratinocytes, endothelial cells, hepatocytes, synoviocytes, T-lymphocytes and dendritic cells. TNF stimulates the production of proinflammatory cytokines, vascular endothelial growth factor, chemokines and the expression of adhesion molecules which participate in the inflammatory response [11]. TNF α , which plays an important role in the cochlear secondary immune response, has been found to be expressed in cells of the endolymphatic sac lumen of mice injected with KLH [22]. However, animals treated with systemic injection of the TNF blocker showed a reduced number of cells in the endolymphatic sac lumen [22]. In addition, TNF α blockers inhibit the formation of granulomas [14, 24] that appear in the scala tympani of an animal with immuno-induced deafness [6].

The TNF α blocking agents (etanercept, infliximab, adalimumab) are not yet widely applied for the treatment of immuno-mediated inner ear disease [19, 20].

None of these drugs has an official FDA indication for IMIED. The efficacy of these agents to reduce inflammation and hearing loss has been studied in an animal model of experimentally induced labyrinthitis. Using etanercept, Wang et al. [25] were able to block the immuno-mediated inner ear damage in a guinea pig model and reduced the inflammation and hearing loss associated with experimentally induced labyrinthitis. Since the human inner ear is not amenable to diagnostic biopsy, animal models of autoimmune labyrinthitis provide the experimental evidence supporting the existence of different immune responses inside the inner ear and enable the response to the different treatments used at the present time in IMIED to be evaluated. However, the different protocols employed to establish the diverse models of experimental autoimmune labyrinthitis (EAL) have often given rise to different or even contradictory results [7]. In most of the studies published, surgical trauma led only to a slight hearing loss, from 0 to 30 dB, and the inflammatory changes that immunised animals present were not observed [3, 16]. In our experience, surgical trauma is responsible for a hearing loss of between 15 and 20 dB. If this loss is taken into consideration, both corticoid and etanercept therapy are able to reverse almost completely the hearing loss due to the inflammatory response but not to the surgical trauma. It is possible that there will be an even greater recovery if drugs are used at doses commonly employed in clinical practice.

The uncommon but certain serious adverse effects of anti-TNF, including severe bacterial infections, tuberculosis and opportunistic infections, demyelinating syndromes, lupus-like reactions and a potential relationship to lymphoma, bring into question the suitability of this therapy [2]. An additional drawback is its very controversial high cost. Therefore, the debate will remain ongoing with respect to the eligibility for treatment with etanercept [1, 9]. There is not enough diverse clinical data on the efficacy of treating immuno-mediated inner

Table 1 Comparison of 6-methyl -prednisolone (glucocorticoid) and etanercept (TNF α blocker)

Drug	Blockage of the immune system	Dose for IMIED	Frequent side effects	Severe adverse effects	Cost of treatment
6-Methyl -prednisolone	Inhibits the secretion of the IL-1 system, IFN- γ and recirculation of CD4+ T-induced apoptosis of activated lymphocytes	1 mg/kg/day for 4 weeks, followed by a slow tapering off	Fluid retention, high blood pressure	Gastric ulcer, diabetes, cataract, osteoporosis, bone fractures	52.38 € ^a ; 55.44 € ^b
Etanercept	TNF α	25 mg twice weekly i.m.	Itching, pain, swelling, redness at the site of injection, headache, dizziness, nasal and throat irritation	Multiple sclerosis, myelitis, optic neuritis, opportunistic infections, lymphoma	6,356 € ^c

^aCost in euros estimated for an adult weighing 70 kg at an initial dose of 1 mg/kg per day and tapering off with a maintenance dose of 16 mg for 2 months

^bEstimated for an adult weighing 70 kg and an initial dose of 1 mg/kg per day and tapering off with a maintenance dose of 8 mg for 5 months

^cEstimated for an adult and 6 months of treatment

ear disease with TNF α blockers, and they have been investigated in very few studies of experimentally induced labyrinthitis in animal models [19, 25]. Etanercept was not more effective than corticoids in the present study. Moreover, its potentially adverse effects and the fact that it is much more expensive than glucocorticoids have made us reconsider its usefulness in the therapeutic armamentarium of IMIED as an initial therapy (Table 1). Corticoids pass through the round window of the inner ear, thus reaching good therapeutic levels in the inner ear fluids, and are also used in local therapy [12]. There is less experience with etanercept, although Wang et al. [25] found it also to be effective when administered by this route, which may provide the means of avoiding the adverse systemic effects normally observed with TNF α blockers.

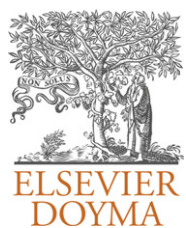
In the present investigation, the statistically significant reduction in ABR observed after immunisation in both the steroid and etanercept experimental group of animals compared with the control group confirms the efficacy of etanercept, which is comparable to that of steroids. However, extrapolation from this animal model to what may happen during immuno-mediated inner ear disease treatment with etanercept is not possible until results from controlled human studies are available. A recent study does not support any substantial efficacy of etanercept among patients with immuno-mediated cochleovestibular disorders with respect to improving hearing loss [17]. We conclude that glucocorticoids will remain as the gold standard for the therapeutic management of IMIED.

Acknowledgements The authors thank Isabel Millán, Department of Biostatistics, Universidad Autónoma de Madrid, for her assistance with statistical analysis.

References

- Bansback NJ, Regier DA, Ara R, Brennan A, Shojania K, Esdaile JM, Anis AH, Marra CA (2005) An overview of economic evaluations for drugs used in rheumatoid arthritis: focus on tumour necrosis factor- α antagonists. *Drugs* 65:473–496
- Botsios C (2005) Safety of tumour necrosis factor and interleukin-1 blocking agents in rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 4:162–170
- Carvalho GJ, Lalwani AK (1999) The effect of cochleostomy and intracochlear infusion on auditory brain stem response threshold in the guinea pig. *Am J Otol* 20:87–90
- García-Berrocal JR, Pinilla Urraca M, Ramírez-Camacho R, González Martín F, López Cortijo C (1995) Patología de oído interno de probable origen autoinmune y su respuesta al tratamiento esteroideo. *Acta Otorrinolaring Esp* 46:416–420
- García-Berrocal JR, Vicente J, Arellano B, González FM, Ramírez-Camacho R (1997) Labyrinthitis experimental autoimmune: evaluación de diversos modelos en cobayas. *Acta Otorrinolaring Esp* 48:5–10
- García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Zurita M, Arellano B (2000) Respuesta celular inmune precoz en la labyrinthitis experimental: Estudio inmunohistoquímico. *Acta Otorrinolaring Esp* 51:557–561
- García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Zurita M, de la Fuente R, Lobo D (2004) Controversies and criticisms on designs for experimental autoimmune labyrinthitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 113:404–410
- García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Lobo D (2004) Glucocorticoids: the best therapy for immune-mediated inner ear disease. *Curr Topics Steroid Res* 4:99–104
- García-Berrocal JR, Trinidad A, Ramírez-Camacho R, Lobo D, Verdager JM, Ibáñez A (2005) Immunologic work-up study for inner ear disorders: looking for a rational strategy. *Acta Oto-Laryngol* 125:814–818
- García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Lobo D, Trinidad A, Verdager JM (2006) Adverse effects of glucocorticoids therapy for inner ear disorders. *ORL* (in press)
- Goffe B (2004) Etanercept (Enbrel) – an update. *Skin Therap Lett* 9:1–4
- Goycoolea MV (2001) Clinical aspects of round window permeability under normal and pathological conditions. *Acta Otolaryngol* 121:437–447
- Harris JP, Weisman MH, Derebery JM, Espeland MA, Gautz BJ, Gulya AJ, Hammerschlag PE, Hannley M, Hughes GB, Moscicki R, Nelson RA, Niparko TK, Rauch SD, Telian SA, Brookhouser PE (2003) Treatment of corticosteroid-responsive autoimmune inner ear disease with methotrexate: a randomized controlled trial. *JAMA* 290:1875–1883
- Kahna D, Liebling MR, Louie JS (2003) Etanercept ameliorates sarcoidosis arthritis and skin disease. *J Rheumatol* 30:1864–1867
- Lobo D, García-Berrocal JR, Trinidad A, San Román J, Ramírez-Camacho R (2003) Local alternatives to systemic inner ear therapy. In: 3rd Int Symp Inner Ear Pharmacol. Málaga, Spain
- Ma C, Billings P, Harris JP, Keithley EM (2000) Characterization of an experimentally induced inner ear immune response. *Laryngoscope* 110:451–456
- Matteson EL, Choi HK, Poe DS, Wise C, Lowe VJ, McDonald TJ, Rahman MU (2005) Etanercept therapy for immune-mediated cochleovestibular disorders: a multi-center, open-label, pilot study. *Arthritis Rheum* 53:337–342
- McCabe BF (1979) Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 88:585–589
- Rahman MU, Poe DS, Choi HK (2001) Autoimmune vestibulo-cochlear disorders. *Curr Opin Rheumatol* 13:184–189
- Rahman MU, Poe DS, Choi HK (2001) Etanercept therapy for immune-mediated cochleovestibular disorders: preliminary results in a pilot study. *Otol Neurotol* 22:619–624
- Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM (2002) Tumor necrosis factor- α , an initiator, an etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope* 112:1627–1634
- Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM (2003) Proinflammatory cytokine expression in the endolymphatic sac during inner ear inflammation. *JARO* 4:139–147
- Staecker H, Lefebvre PP (2002) Autoimmune sensorineural hearing loss improved by tumor necrosis factor α blockade: a case report. *Acta Otolaryngol* 122:684–687
- Wallis RS, Ehlers S (2005) Tumor necrosis factor and granuloma biology: explaining the differential infection risk of etanercept and infliximab. *Semin Arthritis Rheum* 34:34–38
- Wang X, Truong T, Billings PB, Harris JP, Keithley FM (2003) Blockage of immune-mediated inner ear damage by etanercept. *Otol Neurotol* 24:52–57

ANEXO II



Acta Otorrinolaringológica Española

www.elsevier.es/otorrino



REVISIÓN

Revisión de las terapias biológicas en la enfermedad inmunomediada del oído interno

David Lobo^{a,*}, José R. García-Berrocal^b, Almudena Trinidad^b, José M. Verdaguer^a
y Rafael Ramírez-Camacho^b

^a Servicio de Otorrinolaringología, Hospital El Escorial, Universidad Francisco de Vitoria, San Lorenzo de El Escorial, Madrid, España

^b Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Puerta de Hierro, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

Recibido el 26 de febrero de 2012; aceptado el 23 de abril de 2012

PALABRAS CLAVE

Enfermedad
inmunomediada del
oído interno;
Terapias biológicas;
Etanercept;
Factor de necrosis
tumoral α ;
Anakinra;
Rituximab

Resumen

Introducción y objetivos: La enfermedad inmunomediada del oído interno (EIOI) es una de las escasas afecciones del oído interno que pueden revertirse con tratamiento médico. Este se basa en los corticoides, si bien el tratamiento prolongado con los mismos se asocia a serios efectos adversos, lo que ha propiciado el uso de otros fármacos o vías de administración como la intratimpánica. En este estudio se analiza el papel de las terapias biológicas en el tratamiento de la EIOI.

Material y métodos: Se ha realizado una búsqueda sistemática en PUBMED de aquellos estudios que examinan la respuesta al tratamiento con distintos agentes biológicos en pacientes con EIOI. Se ha analizado los criterios de inclusión y exclusión de cada estudio, así como las características de la población estudiada, el tratamiento utilizado y, los criterios de respuesta y tasa de respuesta alcanzada.

Resultados: Se identificaron 13 estudios relevantes. En 8 estudios se utilizó un inhibidor del TNF α (etanercept, infliximab, adalimumab), en 3 un antagonista de la IL-1 (anakinra) y en el resto se empleó el rituximab, un antagonista del receptor CD20 de los linfocitos B. En la mayoría de los estudios se logró una mejoría o estabilización de la audición en más del 70% de los pacientes tratados.

Conclusiones: Las terapias biológicas pueden tener un papel en el tratamiento de los pacientes con EIOI, al menos en aquellos que responden mal a los corticoides o no se consigue su estabilización. Sin embargo, son necesarios más estudios controlados y aleatorizados para conocer su eficacia.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor par correspondencia.

Correo electrónico: dlobo28@gmail.com (D. Lobo).

KEYWORDS

Immune-mediated
inner ear disease;
Biological agents;
Etanercept;
Tumour necrosis
factor α ;
Anakinra;
Rituximab

Review of the biologic agents used for immune-mediated inner ear disease

Abstract

Introduction and objectives: Immune-mediated inner ear disease (IMIED) is one of the few reversible forms of sensorineural hearing loss. Treatment is based on high-dose corticosteroids, although long-term therapy is associated with serious adverse effects; this has led to the use of other agents or different routes of administration such as transtympanic delivery. This study analyses the role of biological agents in IMIED management.

Material and methods: We searched PUBMED for studies that examined the response to treatment with different biological agents in patients with IMIED. The following data were extracted from the selected studies and entered into a standardised database: exclusion and inclusion criteria, characteristics of the patients studied, treatment, outcome measures and response rates achieved.

Results: Thirteen studies were included in this review. A TNF alpha inhibitor (etanercept, infliximab, adalimumab) was used in 8 studies, an IL-1 antagonist (anakinra) was used in 3 studies and rituximab, an antibody directed against the CD20 surface antigen on B lymphocytes, was evaluated in 2 studies. Most studies achieved a hearing improvement or stabilisation in more than 70% of treated patients.

Conclusions: Biological agents can play a role in the management of patients with IMIED, at least in those patients who do not respond to conventional therapy or whose hearing is not stabilised. However, specially-designed randomised controlled clinical trials are needed to assess their effectiveness.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El conocimiento de la enfermedad inmunomediada del oído interno (EIOI)¹ supone la posibilidad de interferir en su evolución deteniendo su progresión e incluso mejorando la función del órgano afectado mediante el uso de fármacos antiinflamatorios o inmunomoduladores, como los esteroides, que constituyen el *gold standard* del tratamiento². Sin embargo, la EIOI continúa representando un reto diagnóstico, no existiendo marcadores completamente específicos aunque sí perfiles de riesgo^{3,4}, y terapéutico ya que un porcentaje importante de pacientes no responden adecuadamente al tratamiento. Estas circunstancias están estrechamente relacionadas puesto que la falta de un diagnóstico netamente definido puede conducir a tratar pacientes que no presentan una EIOI, y por lo tanto, a una ausencia de respuesta a los corticosteroides, como sucede con las enfermedades autoinflamatorias. Además, la utilización de corticoides a dosis altas durante largos períodos de tiempo se asocia a efectos adversos inaceptables⁵. Se han utilizado otros tratamientos que pese a ser prometedores en un principio no han demostrado eficacia en estudios más rigurosos, como el metotrexate⁶, o bien presentan un perfil de efectos adversos inadecuado, como la ciclofosfamida o la leflunomida. Todo ello ha reconducido la investigación a la búsqueda de nuevos fármacos o vías de administración más seguras como la intratimpánica^{7,8}.

En este estudio se analiza el papel de las terapias biológicas en el tratamiento de la EIOI. Los agentes biológicos son proteínas de fusión o anticuerpos monoclonales creados para bloquear componentes específicos de la cascada inflamatoria. A pesar de la experiencia creciente con la utilización de estos fármacos en otras enfermedades autoinmunes como

la artritis reumatoide no existe mucha experiencia en el tratamiento de la EIOI⁹.

En concreto se estudia el papel de algunos inhibidores del TNF como el etanercept, el infliximab o el adalimumab, antagonistas del receptor de la interleucina-1 como el anakinra, y otros tratamientos como el rituximab. Destaca la utilización de los inhibidores del TNF, que actúan bloqueando el TNF, una citocina proinflamatoria producida especialmente por macrófagos que se expresa en el oído interno de forma precoz durante la respuesta inflamatoria¹⁰.

Hemos revisado la literatura buscando publicaciones en las cuales se presenten los resultados del uso clínico de estas terapias en el tratamiento de la EIOI.

También se ha estudiado la eficacia de estos tratamientos en el abordaje de la hipoacusia neurosensorial que aparece en el contexto de algunas enfermedades autoinflamatorias como el síndrome de Muckle-Wells o el síndrome CINCA. Presentan un cuadro clínico similar al de algunas enfermedades autoinmunes sistémicas, sin embargo, no responden a los corticosteroides y tienen un probable origen genético¹¹.

Material y métodos

Se ha realizado una búsqueda sistemática en PUBMED de aquellos estudios que examinan la respuesta al tratamiento con distintas terapias biológicas en pacientes con EIOI. Secundariamente se han incluido también aquellos estudios que incluyen o analizan la respuesta a las terapias biológicas en pacientes con hipoacusia neurosensorial secundaria a otras enfermedades autoinmunes o autoinflamatorias.

En concreto hemos utilizado la siguiente estrategia de búsqueda: («Hearing loss, Sensorineural» [Mesh]) AND («TNFR-Fc fusion protein» [supplementary Concept]) OR

(«*Hearing loss, Sensorineural*» [Mesh] AND «*Interleukin 1 Receptor Antagonist*» OR («*Antirheumatic agents*» [Pharmacological Action] AND («*Hearing loss, Sensorineural*» [Mesh].

Así mismo, se revisaron las referencias de todos los estudios seleccionados en busca de otros estudios potencialmente relevantes.

Se han analizado los criterios de inclusión, características de la población estudiada, tratamiento utilizado, criterios de respuesta al tratamiento dentro de cada estudio y la tasa de respuesta alcanzada. Por último, se destaca si los estudios constituyen series de casos o ensayos clínicos controlados y aleatorizados.

Resultados

Se identificaron un total de 13 artículos relevantes. Tres estudios analizan la respuesta al etanercept, 2 al rituximab, 3 al infliximab, 3 al anakinra, uno al adalimumab y finalmente un estudio analiza la respuesta al tratamiento combinado de etanercept y metotrexate. En aras de una mayor claridad los estudios se han agrupado en 3 grupos distintos de tratamiento.

Inhibidores del TNF α (etanercept, adalimumab e infliximab)

Actúan uniéndose al TNF soluble o fijado al receptor de TNF (infliximab) o bien uniéndose directamente al receptor (adalimumab) o compitiendo con los mismos (etanercept). Su uso está indicado en la artritis reumatoide moderada o severa, en monoterapia o en combinación con metotrexate. También se utilizan en la psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilopoyética o en la colitis ulcerosa.

El estudio de Rahman et al. de 2001 es el más antiguo identificado en esta búsqueda¹². En este estudio piloto retrospectivo se analiza la respuesta al etanercept en un grupo de 12 pacientes con hipoacusia neurosensorial, de los cuales solo uno presentaba hallazgos sugestivos de enfermedad autoinmune sistémica. Los criterios de inclusión utilizados fueron los siguientes: 1) hipoacusia neurosensorial bilateral o síntomas de enfermedad de Meniere con hipoacusia progresiva reciente, 2) respuesta clara a altas dosis de esteroides, y/o 3) presencia de anticuerpos anti-HSP70.

Matteson et al. y Cohen et al. utilizan unos criterios de inclusión parecidos, si bien no descartan los pacientes con

hipoacusia unilateral ni tienen en cuenta el resultado del otoblot® (anticuerpos frente a la proteína de 68 kD) y sí excluyen a los pacientes con enfermedades inflamatorias sistémicas como la artritis reumatoide, o el lupus eritematoso sistémico (LES)^{13,14}.

En los 3 estudios se utilizan parecidos criterios de respuesta al tratamiento: mejoría de 15 dB en una frecuencia o de 10 dB en 2 frecuencias, o mejoría del 12 o el 15% en el reconocimiento de palabras. Sin embargo, en el de Cohen et al., un estudio controlado con placebo y randomizado solo se considera una respuesta al tratamiento cuando estos objetivos se logran en la semana octava del tratamiento.

Respecto a las características de la población estudiada es muy similar en los 3 estudios con una edad media en torno a los 50 años y una distribución homogénea en cuanto al sexo.

En los 3 estudios cabe destacar la mínima presentación de efectos secundarios, siendo estas reacciones locales en el punto de inyección.

El resto de los estudios consisten en un estudio retrospectivo¹⁵, un estudio piloto prospectivo no randomizado¹⁶ y en la presentación de un caso clínico¹⁷⁻¹⁹. El estudio de Van Wijk et al. evalúa la respuesta a la administración transtimpánica de infliximab, siendo el único de todos los estudios revisados que utiliza esta vía de administración.

Las tasas de respuesta se pueden observar en la [tabla 1](#). En el estudio de Matteson et al. (estudio prospectivo) mejoró la audición en el 30% de los pacientes y se estabilizó en el 57%¹³.

Antagonistas de la IL-1 (anakinra)

La anakinra es un antagonista del receptor de IL-1. Está indicado en la artritis reumatoide moderada o severa en pacientes mayores de 18 años con mala respuesta a uno o varios fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad, en monoterapia o asociado a otros fármacos a excepción de los inhibidores del TNF.

Los estudios de Rigante, Rynne y Gerard estudian la respuesta al anakinra en los pacientes con enfermedad autoinflamatoria (CINCA, síndrome de Muckle-Wells)²⁰⁻²² ([tabla 2](#)).

Los 3 estudios consisten en la presentación de un caso clínico.

Tabla 1 Respuesta a anti-TNF α (etanercept, infliximab y adalimumab)

Primer autor	Año	Tratamiento	Pacientes (n)	Edad media (años)	Estabilización o mejoría (%)	Dosis y vía administración
Rahman et al. ¹²	2001	Etanercept	12	47	91	25 mg \times 2 cada 7 días sc
Matteson et al. ¹³	2005	Etanercept	23	48	87	Igual
Cohen et al. ¹⁴	2005	Etanercept	20	52	12,5	Igual
Street. ¹⁷	2006	E/metotrexate	1	56	100	25 mg \times 2/s sc
Morovic. ¹⁸	2010	Adalimumab	1	30	100	40 mg/s 12 s
Liu. ¹⁵	2011	Infliximab	8	57	0	320-600 mg iv/4-12 s
Van Wijk. ¹⁶	2006	Infliximab	9	51	77	0,3 ml/s 4 s transtimpánico
Staecker. ¹⁹	2002	Infliximab	1	35	100	NA

E: etanercept; iv: intravenoso; NA: no aportado; s: semana; sc: subcutáneo.

Tabla 2 Respuesta a anakinra en pacientes con enfermedad autoinflamatoria

	Rigante et al. ²⁰	Rynne et al. ²¹	Gerard et al. ²²
Año	2006	2006	2007
N.º de pacientes	1	1	1
Edad	7	59	64
Porcentaje de mejoría		100	0
Porcentaje de estabilización	100		
Enfermedad autoinflamatoria	CINCA	Síndrome de Muckle-Wells	Síndrome de Muckle-Wells
Dosis	1 mg/kg/día	No se aporta información	100 mg/día

CINCA: síndrome crónico, infantil, neurológico, cutáneo y articular.

En el estudio de Rigante et al. se consigue la estabilización de la audición e un niño de 7 años que no había respondido adecuadamente a ningún tratamiento hasta entonces.

Los estudios de Rynne y Gerard se refieren a pacientes con síndrome de Muckle-Wells. En el primero se describe a una mujer de 59 años, que obtiene una mejoría de 15 a 30 dB en el rango de frecuencias de 250 a 4.000 Hz en las primeras 18 semanas de tratamiento con anakinra. En el segundo a un varón de 64 años con hipoacusia neurosensorial severa que no obtuvo ninguna mejoría en su audición.

Antagonistas del receptor CD20 de los linfocitos B (rituximab)

El rituximab es un anticuerpo monoclonal que actúa uniéndose al receptor CD20 de los linfocitos B induciendo su muerte celular vía apoptosis. Rituximab en combinación con metotrexate está indicado en pacientes con artritis reumatoide que presentan intolerancia o una respuesta inadecuada a otros fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad, incluidos los inhibidores del TNF. También se utiliza en el tratamiento del linfoma no Hodgkin y en la leucemia linfocítica crónica.

El estudio de Cohen et al. es un ensayo clínico en el que se evalúa la respuesta a rituximab en un grupo de pacientes con hipoacusia neurosensorial bilateral, progresiva e idiopática, que previamente han respondido a un tratamiento con corticosteroides. Se considera una respuesta positiva cuando esta se mantiene a las 24 semanas de iniciar el tratamiento con rituximab.

En el estudio de Orsoni et al. se presenta a una mujer de 25 años con síndrome de Cogan e hipoacusia neurosensorial progresiva pese a recibir tratamiento con ciclofosfamida, metotrexate, ciclosporina, prednisona y adalimumab. Solo con rituximab se obtiene una mejoría de 16 dB en las frecuencias centrales, ganancia que se mantiene 12 meses después.

Por último, en la [tabla 3](#) se recogen los resultados obtenidos en los estudios de Cohen et al. y Orsoni et al.^{23,24}.

Discusión

La EIOL es una de las pocas causas de hipoacusia neurosensorial que pueden ser revertidas o detenidas mediante un tratamiento adecuado. Estos pacientes generalmente responden a dosis altas de corticosteroides, sin embargo,

Tabla 3 Tasas de respuesta a rituximab

	Cohen et al. ²³	Orsoni et al. ²⁴
Año	2011	2010
N.º de pacientes	7	1
Edad media	47	25
Porcentaje de mejoría	71	100
EAS	0	Síndrome de Cogan
Dosis	1.000 mg × 2 iv	500 mg iv/s 4 s

EAS: enfermedad autoinmune sistémica.

la pérdida auditiva a menudo ocurre cuando se reduce o se interrumpe el tratamiento. El tratamiento con corticosteroides a dosis altas durante largos períodos de tiempo se asocia a efectos adversos inaceptables, por lo que se han probado otros tratamientos. Así, el metotrexate no ha demostrado eficacia en ensayos clínicos controlados y aleatorizados y otros tratamientos inmunosupresores presentan demasiada toxicidad, por lo que no se utilizan mucho en la actualidad^{5,6,25,26}.

En este contexto se han comenzado a ensayar terapias biológicas que ya son utilizadas en el contexto de otras enfermedades autoinmunes con una gran eficacia y escasos efectos adversos^{9,27,28}. Los agentes biológicos son proteínas de fusión o anticuerpos monoclonales creados para bloquear componentes específicos de la cascada inflamatoria.

Dentro de las terapias biológicas los inhibidores del TNF han sido los más utilizados. El TNF es una citocina proinflamatoria producida por múltiples células, especialmente macrófagos, que promueve la inflamación activando los macrófagos, estimulando la maduración y la migración de las células dendríticas, activando los neutrófilos y las células NK, aumentando la permeabilidad vascular, etc. Fue aislado por primera vez en 1975 por Carswell et al.²⁹ en un intento de identificar los factores responsables de la necrosis del sarcoma Meth. Se ha observado que se expresa en distintas estructuras del oído interno de forma precoz durante la respuesta inflamatoria³⁰. Es secretado por macrófagos, monocitos, linfocitos B y T, y por fibroblastos del ligamento espiral y estimula la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS/NOS II) en la cóclea de cobaya con posibles efectos neurotóxicos en el oído interno³¹.

El TNF α es un componente clave de la defensa del organismo frente al *M. tuberculosis* y otras enfermedades granulomatosas, por lo que se aconseja el cribado con radiografía de tórax o Mantoux antes de iniciar el tratamiento.

Tabla 4 Principales agentes biológicos utilizados en EIOI

Molécula	Nombre comercial	Síntesis	Anti	Mecanismo de acción	Precio (€) ^d
Infliximab ^a	Remicade [®]	Quimérico	TNF α	Unión al TNF soluble y fijado	2.463,52
Etanercept ^b	Enbrel [®]	Humanizado	TNF α	Compite con receptores del TNF	1.090
Adalimumab ^c	Humira [®]	Humanizado	TNF α	Unión al receptor de TNF	4.510,28
Anakinra	Kineret [®]	Humanizado	IL-1	Antagonista del receptor de IL-1	1.944,24
Rituximab	Mabthera [®]	Quimérico	CD 20	Unión al receptor CD 20 de linfocitos B	2.899,15

^a Anticuerpo recombinante quimérico humano-ratón, que se une al TNF soluble y unido al receptor.

^b Dímero compuesto de la porción extracelular de 2 receptores de TNF α y la porción Fc de la IgG1 humana.

^c Anticuerpo monoclonal recombinante, formado por varias secuencias peptídicas humanas.

^d Precio estimado para 8 semanas de tratamiento a las dosis habituales.

Aunque es muy poco frecuente los inhibidores del TNF pueden inducir un LES.

El etanercept, un inhibidor del TNF α , ha demostrado su eficacia en modelos experimentales de laberinitis autoinmune en el cobaya, equiparando su eficacia a la de los corticoides^{32,33}.

Desde entonces se han desarrollado otros inhibidores del TNF, así como otros agentes biológicos. En la [tabla 4](#) se muestran junto con su mecanismo de acción. En la [fig. 1](#) se muestra la cascada inflamatoria que conduce a la lesión del oído interno señalando dónde actúan los distintos agentes biológicos estudiados.

El porcentaje de mejoría y estabilización de la audición alcanzado en muchos de los estudios analizados parece apoyar el papel de los inhibidores del TNF en la estabilización de la audición cuando el tratamiento con corticoides fracasa o es inadecuado. Cabe destacar la mejoría que se obtiene en otros síntomas acompañantes como el vértigo, que depende más de la estabilización de la función vestibular.

El estudio de Cohen et al.¹⁴, un estudio controlado y aleatorizado, presenta unos resultados más pobres abriendo muchos interrogantes. Matteson et al.¹³ mantiene el

tratamiento durante 24 semanas y Rahman et al.¹² durante 6 a 12 meses. Sin embargo, en el estudio de Cohen et al.¹⁴ solo se emplea etanercept durante 8 semanas y se analiza la respuesta buscando significación estadística solo al final de la octava semana de tratamiento. Se apoyan en el hecho de que los pacientes con artritis reumatoide obtienen una respuesta establecida al cabo de 8 a 12 semanas de tratamiento. No obstante, se acepta la posibilidad de una tasa mayor de respuesta de haber prolongado el tratamiento.

Van Wijk et al.¹⁶ sugieren que la falta de respuesta en los pacientes del estudio de Cohen et al.¹⁴ se debe a que estos presentaban enfermedad quiescente, mientras que en su estudio todos los pacientes habían mostrado una respuesta reciente a los corticoides. Además, este estudio abre la puerta al tratamiento intratimpánico con agentes biológicos como el infliximab.

En el estudio de Liu et al.¹⁵ no se observa ninguna respuesta, sin embargo todos los pacientes eran ya refractarios al tratamiento con corticoides, metotrexato o ciclofosfamida antes de iniciar el ensayo con infliximab.

El rituximab es un anticuerpo quimérico monoclonal que se une al receptor CD20 de los linfocitos B disminuyendo su número ([fig. 1](#)).

Los pocos estudios en los que se ha ensayado el rituximab ofrecen unos resultados muy esperanzadores, con una tasa alta de respuesta. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder obtener conclusiones fiables.

La anakinra es un antagonista de los receptores de IL1. El síndrome CINCA (crónico, infantil, neurológico, cutáneo y articular) y el síndrome de Muckle-Wells (urticaria, hipoa-cusia neurosensorial progresiva y amiloidosis sistémica AA) forman parte de un grupo de síndromes febriles autoinflamatorios causados por mutaciones en el gen CIAS/NALP3 del cromosoma 1q44³⁴. Estas mutaciones parecen interrumpir los mecanismos de apoptosis y conducir a una sobreexpresión de IL-1 con devastadores efectos proinflamatorios. El diagnóstico es puramente clínico aunque hoy día es posible hacer un diagnóstico genético. Anakinra representa un novedoso y prometedor tratamiento en estos pacientes controlando y revirtiendo la sintomatología, si bien el papel que pueda tener en el tratamiento de la hipoa-cusia neurosensorial debe ser aún dilucidado. No es posible extraer conclusiones de los artículos analizados, dado el escaso número de pacientes y los resultados contradictorios. En el estudio de Gerard et al.²², el paciente presentaba una hipoa-cusia neurosensorial profunda establecida, lo que podría explicar la ausencia de respuesta al tratamiento.

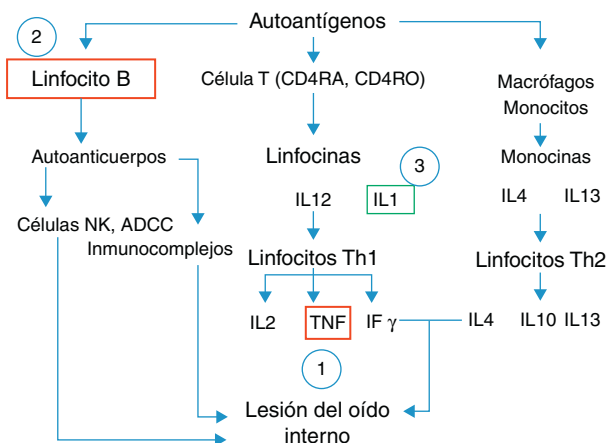


Figura 1 Mecanismo autoinmune sugerido en la EIOI. Se indican con un número dentro de un círculo los lugares de acción de los agentes biológicos estudiados: 1: etanercept, infliximab y adalimumab actúan bloqueando la acción de TNF; 2: el rituximab provoca la depleción de los linfocitos B al unirse a su receptor CD 20; 3: la anakinra es un antagonista de la IL 1. ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; NK: célula natural killer; TNF: factor de necrosis tumoral.

Estos resultados, aunque deben ser analizados con cautela, pueden ser relevantes para la puesta en marcha de estudios prospectivos.

Conclusión

Las terapias biológicas pueden tener un papel en el tratamiento de los pacientes con EIOI, al menos en aquellos que habiendo presentado una respuesta favorable a los corticoides, no pueden continuar utilizándolos por sus efectos adversos o bien porque no se consigue su estabilización. Sin embargo, existen aún muchos interrogantes.

Por un lado se debe ahondar más en el conocimiento de la fisiopatología, también se debe mejorar el diagnóstico y, por otro lado, la naturaleza fluctuante de la propia enfermedad nos obliga a diseñar estudios más rigurosos, controlados, aleatorizados para poder diferenciar entre la respuesta al tratamiento y la evolución natural de la enfermedad.

Sin duda, todos estos avances conducirán al desarrollo de nuevas y más eficaces terapias y, a un mejor abordaje y control de estos pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- McCabe BF. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1979;88:585-9.
- García-Berrocá JR, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Lobo D. Glucocorticoids: the best therapy for immune-mediated inner ear disease. *Curr Topics Steroid Res*. 2004;4:99-104.
- Lobo D, López FG, García-Berrocá JR, Ramírez-Camacho R. Diagnostic tests for immunomediated hearing loss: a systematic review. *J Laryngol Otol*. 2008;122:564-73.
- García-Berrocá JR, Ramírez-Camacho R, Trinidad A. Autoimmune hearing loss: improving diagnostic performance. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007;58:138-42.
- García-Berrocá JR, Ramírez-Camacho R, Lobo D, Trinidad A, Verdaguer JM. Adverse effects of glucocorticoid therapy for inner ear disorders. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2008;70:271-4.
- Harris JP, Weisman MH, Derebery JM, Espeland MA, Gantz BJ, Gulya AJ, et al. Treatment of corticosteroid-responsive autoimmune inner ear disease with methotrexate: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;290:1875-83.
- García-Berrocá JR, Ibáñez A, Rodríguez A, González-García JA, Verdaguer JM, Trinidad A, et al. Alternatives to systemic steroid therapy for refractory immune-mediated inner ear disease: a physiopathologic approach. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2006;263:977-82.
- Herráiz C, Miguel Aparicio J, Plaza G. Intratympanic drug delivery for the treatment of inner ear diseases. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2010;61:225-32.
- Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, Tindall EA, Fleischmann RM, Bulpitt KJ, et al. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 1999;130:478-86.
- Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Tumor necrosis factor-alpha, an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope*. 2002;112:1627-34.
- Hawkins PN, Lachmann HJ, Aganna E, McDermott MF. Spectrum of clinical features in Muckle-Wells syndrome and response to anakinra. *Arthritis Rheum*. 2004;50:607-12.
- Rahman MU, Poe DS, Choi HK. Etanercept therapy for immune-mediated cochleovestibular disorders: preliminary results in a pilot study. *Otol Neurotol*. 2001;22:619-24.
- Matteson EL, Choi HK, Poe DS, Wise C, Lowe VJ, McDonald TJ, et al. Etanercept therapy for immune-mediated cochleovestibular disorders: a multicenter, open-label, pilot study. *Arthritis Rheum*. 2005;53:337-42.
- Cohen S, Shoup A, Weisman MH, Harris J. Etanercept treatment for autoimmune inner ear disease: results of a pilot placebo-controlled study. *Otol Neurotol*. 2005;26:903-7.
- Liu YC, Rubin R, Sataloff RT. Treatment-refractory autoimmune sensorineural hearing loss: response to infliximab. *Ear Nose Throat J*. 2011;90:23-8.
- Van Wijk F, Staecker H, Keithley E, Lefebvre PP. Local perfusion of the tumor necrosis factor alpha blocker infliximab to the inner ear improves autoimmune neurosensory hearing loss. *Audiol Neurotol*. 2006;11:357-65.
- Street I, Jobanputra P, Proops DW. Etanercept, a tumor necrosis factor alpha receptor antagonist, and methotrexate in acute sensorineural hearing loss. *J Laryngol Otol*. 2006;120:1064-6.
- Morovic Vergles J, Radic M, Kovacic J, Salamon L. Successful use of adalimumab for treating rheumatoid arthritis with autoimmune sensorineural hearing loss: two birds with one stone. *J Rheumatol*. 2010;37:1080-1.
- Staecker H, Lefebvre PP. Autoimmune sensorineural hearing loss improved by tumor necrosis factor-alpha blockade: a case report. *Acta Otolaryngol*. 2002;112:1627-34.
- Rigante D, Ansuini V, Caldarelli M, Bertoni B, La Torraca I, Stabile A. Hydrocephalus in CINCA syndrome treated with anakinra. *Childs Nerv Syst*. 2006;22:334-7.
- Rynne M, Mclean C, Bybee A, McDermott MF, Emery P. Hearing improvement in a patient with variant Muckle-Wells syndrome in response to interleukin 1 receptor antagonism. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:533-4.
- Gerard S, le Gogg B, Maugars Y, Berthelot JM, Malard O. Lasting remission of a Muckle-Wells syndrome with CIAS-1 mutation using half-dose anakinra. *Joint Bone Spine*. 2007;74:659.
- Cohen S, Roland P, Shoup A, Lowenstein M, Silverstein H, Kavanaugh A, et al. A pilot study of rituximab in immune-mediated inner ear disease. *Audiol Neurotol*. 2011;16:214-21.
- Orsoni JG, Laganà B, Rubino P, Zavota L, Bacciu S, Mora P. Rituximab ameliorated severe hearing loss in Cogan's syndrome: a case report. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:18.
- Lasak JM, Sataloff RT, Hawshaw MJ, Carey TE, Lyons KM, Spiegel JR. Autoimmune inner ear disease: steroid and cytotoxic drug therapy. *Ear Nose Throat J*. 2001;80:808-11, 815-6, 818 passim.
- Broughton SS, Meyerhoff WE, Cohen SB. Immune-mediated inner ear disease: 10-year experience. *Semin Arthritis Rheum*. 2004;34:544-8.
- Moreland LW, Cohen SB, Baumgartner SW, Tindall EA, Bulpitt K, Martin R, et al. Long-term safety and efficacy of etanercept in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2001;28:1238-44.
- Keystone E, Fleischmann R, Emery P, Furst DE, van Vollenhoven R, Bathon J, et al. Safety and efficacy of additional courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: an open-label extension analysis. *Arthritis Rheum*. 2007;56:3896-908.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72:3666-70.
- Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Proinflammatory cytokine expression in the endolymphatic

- sac during inner ear inflammation. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2003;4:139–47.
31. Hess A, Bloch W, Huverstuhl J, Su J, Stennert E, Addicks K, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the cochlea of guinea pigs after intratympanic endotoxin-treatment. *Brain Res*. 1999;830:113–22.
32. Wang X, Truong T, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Blockage of immune-mediated inner ear damage by etanercept. *Otol Neurol*. 2003;24:52–7.
33. Lobo D, Trinidad A, García-Berrocal JR, Verdaguer JM, Ramírez-Camacho R. TNFalpha blockers do not improve the hearing recovery obtained with glucocorticoid therapy in an autoimmune experimental labyrinthitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2006;263:622–6.
34. Aganna E, Martinon F, Hawkins PN, Ross JB, Swan DC, Booth DR, et al. Association of mutations in the NALP3/CIA51/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum*. 2002;46:2445–52.

ANEXO III

Diagnostic tests for immunomediated hearing loss: a systematic review

D LOBO, F GARCÍA LÓPEZ*, J R GARCÍA-BERROCAL, R RAMÍREZ-CAMACHO

Abstract

Objective: To quantitatively evaluate the diagnostic accuracy of diagnostic tests for immunomediated hearing loss.

Data sources: We searched Medline and the Cochrane Database of Systematic Reviews for potentially relevant studies.

Study selection: Twenty-five studies met the inclusion criteria of this systematic review. The diagnosis of immunomediated hearing loss was based on the clinical presentation and the response to corticosteroid administration.

Data extraction: The following data were extracted from the selected studies and entered into a standardised database: population demographics; exclusion and inclusion criteria; diagnostic tests; sensitivity; specificity; the number of true positive, true negative, false positive and false negative values; therapy used, including dose and duration; and delay between symptom onset and therapy commencement.

Data synthesis: This systematic review combined data from 679 patients with immunomediated hearing loss, reported by 22 research teams. Substantial heterogeneity was found among the included studies; for this reason, summary sensitivity and specificity values were not computed.

Conclusions: The results of diagnostic tests for immunomediated hearing loss depend on many factors, and there is a risk of potential bias. This is the first time that such a systematic review has been presented; such a review is a more rigorous method of demonstrating the utility of the available diagnostic tests.

Key words: Autoimmunity; Inner Ear; Vestibular Disorders; Sensorineural Deafness

Introduction

Since the initial description by McCabe in 1979,¹ the number of published research articles on immunomediated hearing loss has increased year on year. Immunomediated inner-ear disease is now an accepted nosological entity within ENT practice.

The number of published papers runs into the hundreds, perhaps thousands, and keeping up with primary research is therefore a difficult task. Moreover, many of these studies give unclear, confusing or downright contradictory results; however, when taken together, a more consistent and clear picture may possibly emerge.

The methods used in traditional reviews are not transparent and their results are not reproducible, and therefore uncertainty remains. The lack of rigour and consequent bias of traditional reviews was exposed in the late 1980s, after which a more rigorous, systematic approach began to be employed.²

A systematic review is an overview of primary studies which contains an explicit statement of

objectives, materials and methods, and which has been conducted according to explicit and reproducible methodology.³

Within the field of systematic reviews, a subgroup focuses on the accuracy of diagnostic tests. Systematic reviews and meta-analyses of studies which evaluate the accuracy of diagnostic tests are being published with increasing frequency in the medical literature.^{4,5} The systematic analysis of publications focusing on immunomediated hearing loss is necessary in order to improve the criteria used to study this disease, as has been suggested.^{6,7} The diagnosis of immunomediated hearing loss (mainly in its isolated forms) is difficult, being based on clinical history, response to therapy and exclusion of other pathology.^{8–11} Various methodologies have been developed in order to evaluate different clinical protocols, diagnoses and therapy. The accuracy of diagnostic tests differs among studies. Therefore, a thorough evaluation of diagnostic tests is necessary to ensure that only accurate tests are used in practice.

From the Ear Research Group, Department of Otorhinolaryngology, and the *Department of Epidemiology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Universidad Autónoma de Madrid, Spain.

Accepted for publication: 4 June 2007. First published online 2 October 2007.

Diagnosis of immunomediated hearing loss was first established by McCabe on the basis of a defined clinical pattern and a positive response to dexamethasone and cyclophosphamide therapy.¹ Extensive hospital laboratory investigations were performed, which were negative except for a positive lymphocyte inhibition assay in some patients. The lymphocyte migration inhibition test has subsequently been replaced by the lymphocyte transformation test.^{12,13}

Different studies, using diverse experimental models of autoimmune labyrinthitis,^{14–19} have aimed to improve our understanding of the cellular and humoral responses occurring within the inner ear, by characterising the effects of: specific and non-specific antigens; local and systemic immunisation; circulating immune complexes; inner-ear autoantibodies; and human leukocyte antigen genes. Such investigations have led to the development of numerous diagnostic tests.

Type II collagen²⁰ and other antibodies such as anti-endothelial cells²¹, sulphoglucuronosyl glycolipids autoantibodies²², the major peripheral myelin protein P0²³, etc have been used as serological markers for IMIED.^{24–30}

Harris and Sharp applied the Western blot technique to demonstrate specific antibodies to inner-ear antigens in animal immunised with heterologous inner-ear antigen and also in patients with sensorineural hearing loss.³¹ On the basis of this approach, many antibodies of different molecular weights have been identified.^{32–35}

As immunomediated hearing loss has a wide clinical spectrum, and as new immunopathological techniques are generally cumbersome, there have been several attempts to define a high-risk profile for immunomediated hearing loss. This profile usually considers clinical presentation and the results of non-specific serological tests (such as sedimentation rate and the levels of complement, immunoglobulins, C-reactive protein, etc) as well as specific immunological laboratory tests.^{36–38}

Applying a systematic approach to the study of diagnostic tests used in immunomediated hearing loss may enable: objective appraisal of the evidence; enhanced precision of results, by creating pooled estimates; timely introduction of effective interventions; and generation of promising new research topics.

Material and methods

We searched Medline and the Cochrane Database of Systematic Reviews for potentially relevant studies.

In Medline, we applied the following search strategy: search ('hearing loss, sensorineural/diagnosis' [MeSH] OR 'hearing loss, sensorineural/immunology' [MeSH] OR 'hearing loss, sudden/diagnosis' [MeSH] OR 'hearing loss, sudden/immunology' [MeSH]) AND (autoimmune [all fields] OR 'autoimmune diseases' [MeSH] OR 'immune-mediated' OR 'immune-mediated' OR 'immuno-related' OR 'auto-immune' OR 'sensitivity and specificity' [MeSH]).

The references from all articles selected were scanned for potentially relevant articles that had

not been identified by the original search. All articles related to those selected were scanned for potentially relevant articles, using Pubmed.

Two reviewers (DL and FGL) screened the titles and abstracts of all articles to independently identify relevant articles. Full copies of all selected articles were retrieved by the same two reviewers, who independently selected relevant articles which fulfilled the inclusion and exclusion criteria. Disagreements were resolved by discussion.

Studies published in English, Spanish, French, Italian and German were included; studies published in other languages were excluded.

Twenty-five articles were included in this study, according to the following criteria. The inclusion criteria were: clinical study (no animal models); high level of clinical suspicion (i.e. sensorineural hearing loss, sudden deafness, progressive, fluctuating, Ménière-like); response to corticosteroids; and a diagnostic test as the focus of study. The exclusion criteria were: infants as subjects; less than six subjects; studies of patients with a systemic autoimmune disease; and studies in which a cause of hearing loss other than idiopathic or suspected immunomediated hearing loss was identified.

Although we collected data obtained from cohorts of patients with sensorineural hearing loss of different aetiologies, we report here only data from patients with clinically suspected immunomediated hearing loss.

Two independent reviewers (DL and FGL) extracted the following data from the selected studies (either as reported, or collected from the reported data): population demographics; exclusion and inclusion criteria; diagnostic tests performed; sensitivity and specificity; the number of true positive, true negative, false positive and false negative results; therapy used, including doses and duration; and any delay between symptom onset and therapy commencement. These same reviewers then entered the data into a standardised database. For some studies the number of cases and controls differed from those

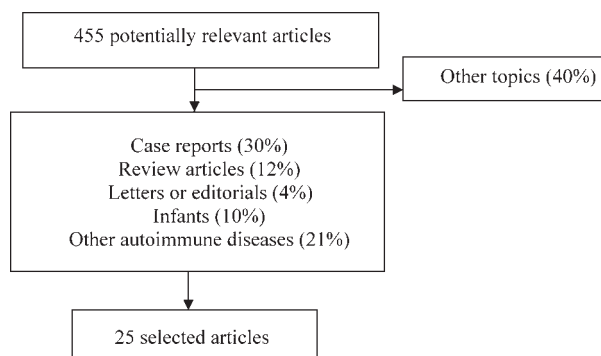


FIG. 1

Search results. The different exclusion criteria, and the percentage of articles presenting those exclusion criteria, are shown. Some articles presented several exclusion criteria (e.g. a case report about a systemic autoimmune disease).

TABLE I
SELECTED ARTICLES

Authors	Year	Total pts (<i>n</i>)	Pt cases (<i>n</i>)	Female cases (%)	Clinical presentation	Diagnostic test
McCabe ¹	1979	18	6	NA	PSNHL	Lymphocyte inhibition assay
Brookes ³⁹	1985	64	28	NA	PSNHL	Immune complex
Kempf & Hornig ⁴⁰	1987	33	24	NA	SSNHL PSNHL	Anti-endothelial, anti-sarcolema, anti-smooth muscle
Hughes <i>et al.</i> ⁴¹	1988	52	52	65.5	FSNHL	Lymphocyte transformation test
Helfgott <i>et al.</i> ⁴²	1991	18	9	NA	PSNHL	Type II collagen antibodies
Lejeune & Charachon ⁴³	1991	23	10	47.8	PSNHL FSNHL	Lymphocyte transformation & non-specific serologic test
Veldman <i>et al.</i> ⁴⁴	1993	46	20	NA	PSNHL SSNHL	Western blot
Cotter <i>et al.</i> ⁴⁵	1994	30	17	NA	PSNHL SSNHL	B19 human parvovirus antibodies
Kanzaki <i>et al.</i> ⁴⁶	1994	14	11	NA	PSNHL	Non-specific serologic test
Moscicki <i>et al.</i> ⁴⁷	1994	58	31	NA	PSNHL	Western blot 68 kDa
García-Berrocal <i>et al.</i> ⁴⁸	1995	31	19	NA	PSNHL SSNHL	Non-specific serologic test
Rauch <i>et al.</i> ⁴⁹	1995	30	30	47	FSNHL	Hsp 70 antibodies
Disher <i>et al.</i> ⁵⁰	1997	74	74	NA	PSNHL SSNHL	Western blot 68–70 kDa
Quaranta <i>et al.</i> ⁵¹	1997	6	6	NA	PSNHL SSNHL	Immune complex, antinuclear, antimitochondrial
Yamawaki <i>et al.</i> ⁵²	1998	114	74	NA	PSNHL	Anti-SGLPG ELISA
Hirose <i>et al.</i> ⁵³	1999	34	24	NA	PSNHL SSNHL	Western blot, PCR
Zavod <i>et al.</i> ⁵⁴	2000	35	35	NA		MRI, HLA
Lunardi <i>et al.</i> ⁵⁵	2002	98	8	37.5	Cogan	Cogan peptide
Lorenz <i>et al.</i> ⁵⁶	2002	24	12	75	PSNHL	ELISPOT INF- γ T cells
García-Berrocal <i>et al.</i> ⁵⁷	2002	81	59	NA	PSNHL SSNHL FSNHL	Hsp 70 ANAs, CD4
Cadoni <i>et al.</i> ⁵⁸	2002	32	25	NA	SSNHL	Anti-endothelial antibodies
García Callejo <i>et al.</i> ⁵⁹	2003	51	30	NA	PSNHL SSNHL FSNHL	Western blot 68, 33, 35, 220 kDa
Mazlumzadeh <i>et al.</i> ⁶⁰	2003	15	10	NA	PSNHL SSNHL	PET
Loveman <i>et al.</i> ^{61†}	2004	23	13	NA	PSNHL	Anti 68 kDa antibodies
Zeitoun <i>et al.</i> ^{62†}	2005	63	28	NA	PSNHL SSNHL	Western blot 68, 72 kDa, ANAs, rheumatoid factor

Only patients not responding to therapy were considered as controls. †The presented numbers of cases and controls differ from those described by the authors, as only those patients responding to steroids were considered as cases. Pt = patient; NA = percentage could not be calculated; PSNHL = progressive sensorineural hearing loss; SSNHL = sudden sensorineural hearing loss; FSNHL = fluctuating sensorineural hearing loss; SGLPG = sulfoglucuronosyl lactosaminyl paragloboside; Hsp = heat shock protein; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; PCR = polymerase chain reaction; MRI = magnetic resonance imaging; HLA = human leukocyte antigen; ELISPOT = enzyme-linked immunosorbent spot; INF = interferon; ANA = antinuclear antibodies; PET = positron emission tomography

described by the authors, as only patients not responding to therapy were considered as controls.

Discrepancies were checked and resolved by an independent reviewer (JRGB). We reviewed the data reported by each study and removed any studies containing duplicated data.

Statistical analysis was performed using Meta-DiSc (freeware) software, in order to allow meta-analysis of studies.⁶³ Summarised sensitivity

and specificity results were not computed, because of the substantial heterogeneity among studies.

Results

Our search of the two databases identified a total of 455 potentially relevant articles, of which 25 fulfilled the inclusion criteria.^{1,39–62} Seventy-six per cent of articles were excluded after reading the title and

abstract. Another 18 per cent were excluded after reviewing the full article (Figure 1). One article was written in Chinese and was also excluded.

The systematic review considered 679 patients and 450 controls, studied by 22 research teams (Table I). Patients' ages at study entry had a mean value of 42.3 years and ranged from 11 to 84 years. The median duration of disease follow up across study cohorts was 5.1 years.

Substantial heterogeneity was found among the included articles. Cohorts were variously recruited from out-patient clinics, in-patient units or emergency departments, or were of 'mixed' provenance; however, in most studies, patients' sites of recruitment was not stated.

Patients' clinical characteristics varied among studies. Four per cent of the studies recruited patients with sudden deafness, 35 per cent recruited those with progressive deafness, 8 per cent recruited those with Ménière's disease, and 54 per cent recruited 'mixed' patients with sudden, progressive or fluctuating hearing loss.

The studies also varied in their inclusion and exclusion criteria. Most studies excluded patients with any other known causes of sensorineural hearing loss. A few did not report any exclusion criteria. Response to steroids was an inclusion criterion in only 20 per cent of studies, although all studies presented patients who have received a trial of steroid therapy. There is no reference standard for the diagnosis of immunomediated hearing loss. However, 9 per cent of studies used the test for 68 kDa protein as a reference in order to evaluate the sensitivity and specificity of their diagnostic test (Table II).

The delay between symptom onset and diagnostic testing was only evaluated in three studies; these reported a mean of 5.5 weeks and a range of one week to one year.

The most frequently employed therapy for immunomediated hearing loss was methylprednisolone

1 mg/kg per day for a minimum period of seven days, tapering off for another three to eight weeks, and usually continuing at a maintenance dose of 8 to 16 mg until clinical stabilisation. Other therapies also employed were: methotrexate (four patient cohorts), cyclophosphamide (two cohorts) and plasmapheresis (four cohorts).

Criteria for response to therapy were presented in 16 studies. Thirty-six per cent of the studies did not present any therapeutic response criteria (Table II).

Only five studies presented data on the duration of patient follow up. Of those that did, the mean value was 5.1 years and the range one month to 17 years.

Three hundred and forty-four patients underwent either Western blot or enzyme-linked immunosorbent assay analysis for the 68 kDa antigen. Other tests employed are presented in Table I.

Seven studies used a Western blot test to detect the 68 kDa antibody, whereas three used Western blotting on cochlear cell extracts to enable detection of different cochlear autoantibodies. Two studies evaluated the utility of diagnostic imaging (magnetic resonance and proton-emission tomography) in cases of immunomediated hearing loss.

The sensitivity and specificity of anti-68 kDa protein testing using Western blotting were respectively 0.48 (0.39–0.56 95 per cent confidence interval (CI)) and 0.57 (0.46–0.67 CI) (Figure 2). The sensitivity of other diagnostic tests was close to 0.4 (Average). The lowest sensitivity values were obtained for non-specific serological tests. The highest sensitivity and specificity values were obtained for analysis of Cogan peptide antibodies (which contributed to the characterisation of Cogan's syndrome). The lowest specificity values were obtained for the determination of human parvovirus B19 immunoglobulins, positron emission tomography, and non-specific serological and immunological tests (Figure 3).

Discussion

The diagnosis of autoimmune hearing loss described by Mc Cabe in 1979 was based on a defined clinical pattern and a positive response to dexamethasone and cyclophosphamide therapy.¹ In the last three decades, many case reports, aetiopathogenic hypotheses, animal experimental models, immunological testing techniques and therapeutic concepts have been presented.^{6–11}

Experimental studies have illustrated that immunomediated and autoimmune pathology can affect the inner ear.^{14–19} These experiments have led to the development of numerous diagnostic tests. However, most of these tests have not been widely taken up in clinical practice, and their results are often controversial. Therefore, the accuracy of such diagnostic tests needs to be evaluated.

We found significant heterogeneity among the selected studies, regarding such factors as: subjects; delay between onset of active disease and diagnostic testing; diagnostic tests; reference standards (e.g. Western blot, clinical response to corticosteroids, or none); and treatment response criteria (although

TABLE II

INCLUSION, EXCLUSION AND THERAPY RESPONSE
CRITERIA FOUND IN THE SELECTED ARTICLES

Criteria	Articles (%)
<i>Inclusion (n=25*)</i>	
Sensorineural hearing loss	67
Steroidal response	16
Test for 68 kDa protein	8
Other	9
<i>Exclusion (n=12*)</i>	
Known causes for hearing loss	67
No therapy	8
No diagnostic test	8
Other	18
<i>Therapy response (n=16*)</i>	
PTA >10 dB	31
PTA >15 dB	69
SA >12%	43
SA >15%	14
SA >20%	43

*Number of studies presenting this type of criteria. PTA = pure tone audiometry; SA = speech audiometry

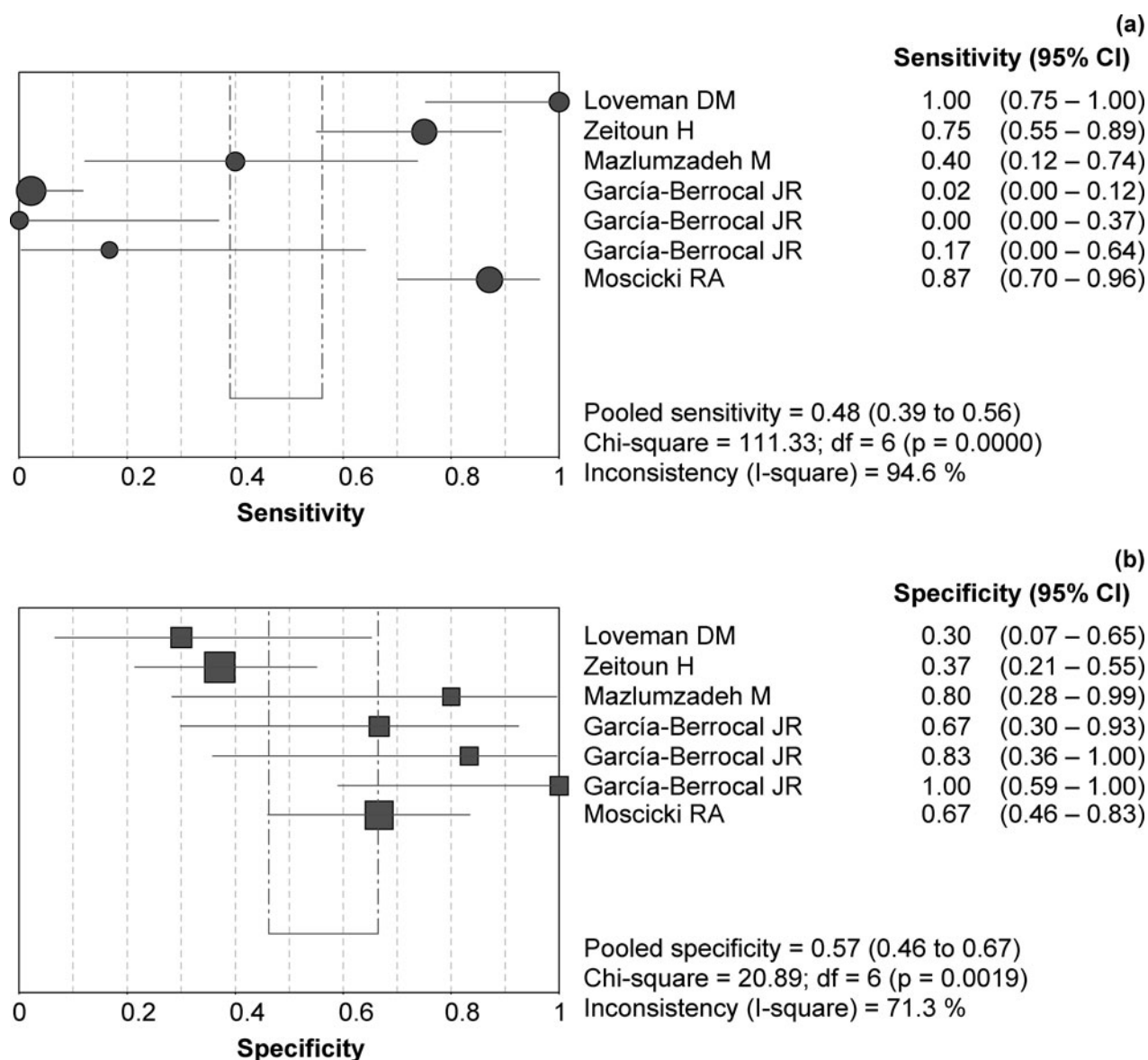


FIG. 2

(a) Sensitivity and (b) specificity of the Western blot test for 68 kDa protein. CI = confidence intervals

comparison of clinical responses to immunosuppressants is very difficult, as different parameters were used to assess hearing recovery). Although variability does not necessarily lead to biased estimates of test performance, it may limit the applicability of results.⁶⁴

Testing for 68 kDa Bloch DB *et al* identified the 68 kDa protein as heat shock protein 70 (hsp70) but later other proteins of 68 kDa such as the choline-transporter like protein 2 have been identified as the target of antibody-induced hearing loss. Therefore, the nature of the 68 kDa protein is not yet completely elucidated protein is not useful in excluding disease, since the sensitivity of this test is low. While nearly all studies suggested poor diagnostic performance for this test, the exact test performance varied substantially. Variability may be attributed to the type of assay used,^{65,66} but also to differences in: duration of symptoms before testing; therapy at the time of testing; and test thresholds. (The selected cut-off value designating a

positive result may also affect the sensitivity and specificity.)^{4,5,64} Furthermore, the sensitivity and specificity of the 68 kDa protein test was greater in some studies researching patients suspected of having only the target condition. This feature has been described as spectrum bias,^{67,68} and the results of such studies of highly selected patient populations lack generalisability.⁶⁴ There is also a potential bias in studies in which the 'gold standard' test is performed only on subjects who have already tested positive for the diagnostic test in question.⁶⁹ Finally, treatment with immunosuppressive drugs at the time of testing might influence the antibody response and could therefore also account for discrepancies in test performance. Titres may also fluctuate with the course of the disease, making appraisal of a positive or negative result even more difficult.

Heterogeneity resulting from all these sources is probably unavoidable and reflects actual clinical

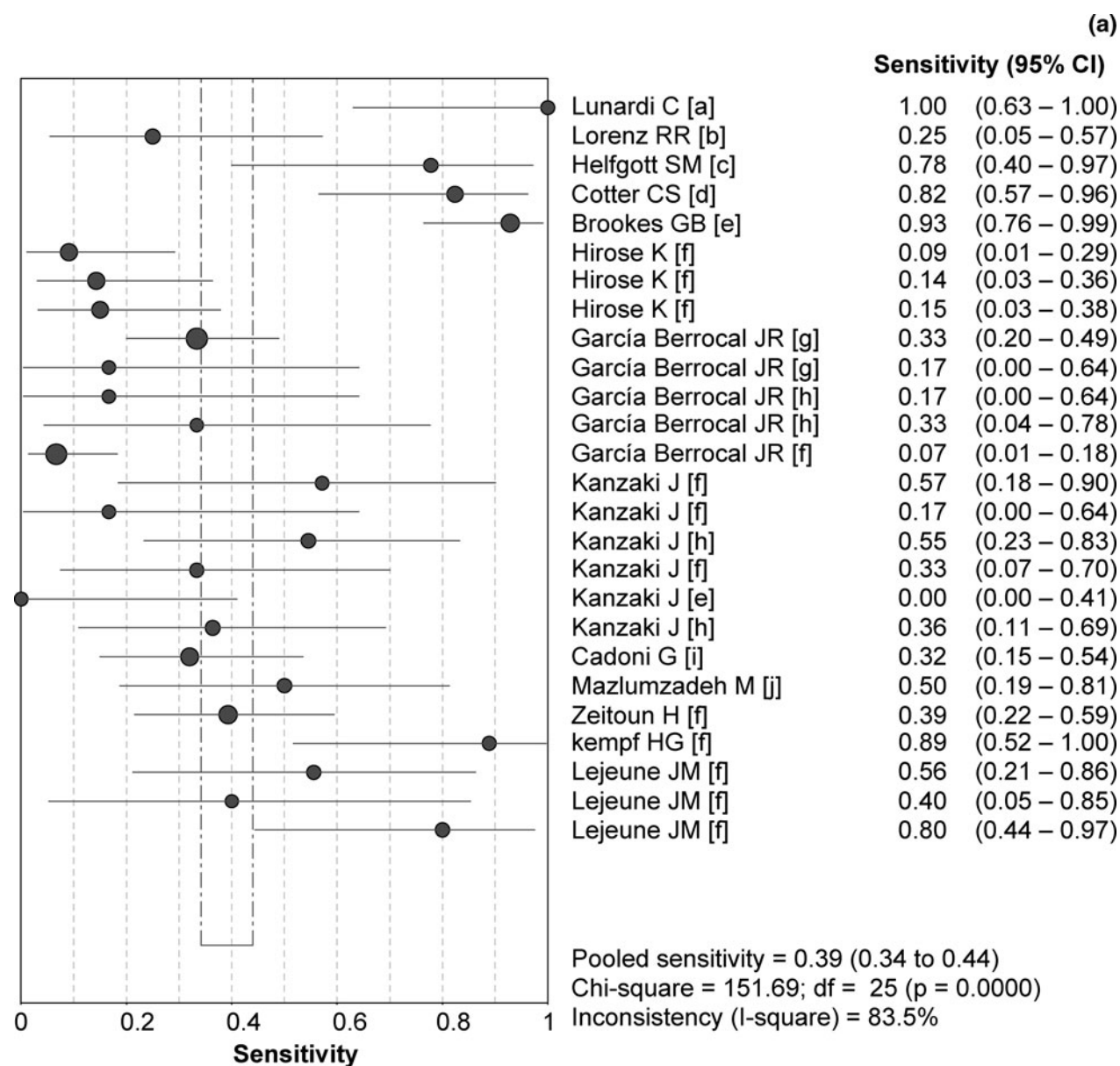


FIG. 3

(a) Sensitivity and (b) specificity of other diagnostic tests: [a] Cogan peptide; [b] increased frequencies of γ interferon producing T cells; [c] type II collagen antibodies; [d] human parvovirus B19 immunoglobulins; [e] immune complex; [f] different serological tests, such as erythrocyte sedimentation rate, complement 3 and 4 levels, and C-reactive protein; [g] lymphocyte subsets; [h] tissue non-specific antibodies (antinuclear antibodies); [i] anti-endothelial cell autoantibodies; [j] positron emission tomography. CI = confidence intervals

practice. Our study had the methodological disadvantage of using data from heterogeneous populations in which there were no common inclusion criteria and (in most cases) no blinded interpretation of test results.

Many difficulties are encountered when a systematic review of diagnostic tests is performed. Papers are not easily identified as studies of diagnostic test accuracy, and the lack of information in the abstract makes it difficult to assess eligibility for inclusion in a systematic review. Systematic reviews of diagnostic tests may be subject to publication bias – bad results are less often published. (We should be aware that the majority of studies that failed to show a diagnostic

value for the 68 kDa protein test may have remained unpublished. If this is so, the true diagnostic performance of anti-68kDa antibody analysis may be even worse than that demonstrated by this review.)

This study had other limitations that need to be considered. There is not a true gold standard diagnostic test for immunomediated hearing loss. When we include response to steroids as a required criteria in the diagnosis of immunomediated hearing loss, we are aware that spontaneous recovery in hearing, as seen in Ménière's disease, may be mistaken for a positive response to corticosteroids.⁶¹ On the other hand, immunomediated hearing loss with a more aggressive course may not respond to

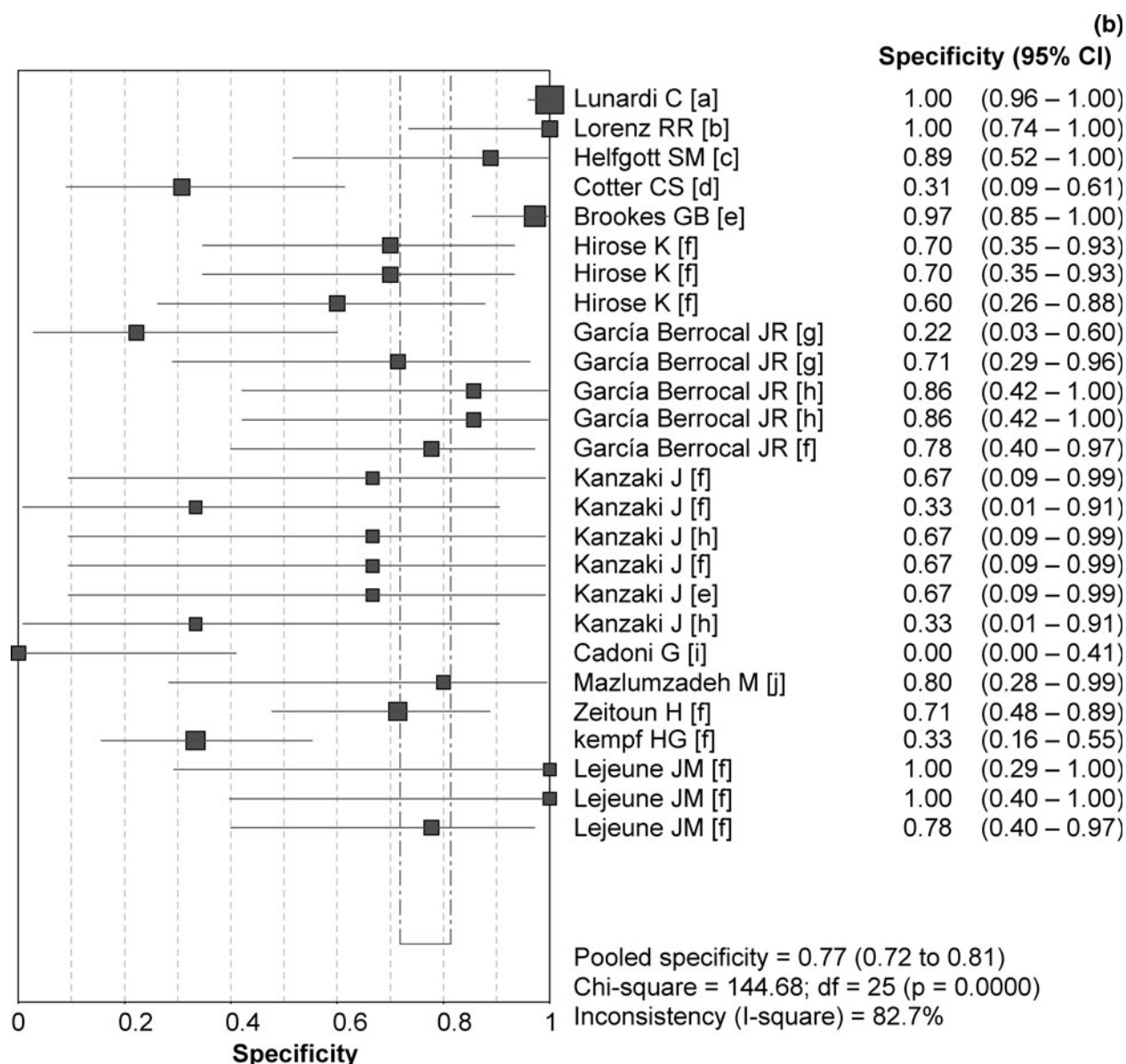


FIG. 3
Continued

corticosteroids, although it may or may not respond to other immunosuppressive therapy.⁶¹ However, most authors accept that the gold standard for diagnosis of immunomediated hearing loss is based on clinical presentation and response to corticosteroid administration.^{6,53,70–72}

Cyclophosphamide remains a therapeutic alternative for patients whose disease becomes refractory to prednisone or who cannot be weaned off steroids. Methotrexate showed no effectiveness in a recent, multicentre trial.⁷³ Other drugs such as etanercept have been used only rarely, and have toxicity and economic considerations.^{74,75}

Another limitation of our study was that patients were classified according to the clinical setting, as suffering progressive, fluctuant or sudden deafness. Whether all patients with immunomediated hearing loss share the same underlying pathophysiology is

still unknown. Such complex presentations might reflect a multifactor pathogenic aetiology with overlapping mechanisms, and we therefore cannot completely exclude the possibility that some of these patients may have been misclassified. We have considered them all as different manifestations of immunomediated hearing loss.

Finally, we did not search for unpublished data or studies published in languages other than English, Spanish, German, French or Italian.

Poor reporting also limited our ability to explore the effect of study design upon results. The methodological weaknesses in the primary studies constitute a weakness in our systematic review.

Our review clarifies that there is a great discrepancy in the criteria being used, and that the results of diagnostic tests for immunomediated hearing loss depend on many factors and potential biases.

Nevertheless, this is the first time that a systematic review (a more rigorous procedure to demonstrate the utility of the available tests) has been presented.

- **Humoral and cellular immune reactions have been implicated in the development of certain types of cochleovestibular dysfunction**
- **The medical literature contains numerous studies describing laboratory tests suggesting an immunological basis for inner-ear disorders**
- **The application of a systematic approach to the study of the diagnostic tests applied in immunemediated inner-ear disease may provide an objective appraisal of the evidence for the existence of these conditions**
- **This approach could limit health care costs by preventing unnecessary testing, and by allowing more rigorous evaluation of the effectiveness of different interventions**

Many of these diagnostic tests have given controversial results. In addition, primary immunomediated hearing loss is a rare disorder, occurring less frequently than sudden sensorineural hearing loss. The application of low sensitivity tests to a population with low disease prevalence will result in low negative and positive predictive values, with a high cost. Hence, it is important to know the accuracy of these tests, since they may not be cost-effective.

There is increasing interest in synthesising information on the diagnostic tests used in autoimmune diseases. A comprehensive, multicentre study may represent a powerful means of rigorously evaluating the various diagnostic tests used for immunomediated hearing loss. Such an approach could limit healthcare costs by preventing unnecessary testing. Such a comprehensive study would need to clearly define the study population, the response criteria and the point at which the diagnostic test is performed, as we propose and as this study evinces.

Acknowledgement

The authors acknowledge the receipt of partial financial support via Spanish Health Ministry grant FIS 050673.

References

- 1 McCabe BF. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979;**88**:585–9
- 2 Mulrow CD. The medical review article: state of the science. *Ann Intern Med* 1987;**106**:485–8
- 3 Greenhalgh T. How to read a paper: papers that summarize other papers (systematic reviews and meta-analyses). *BMJ* 1997;**315**:672–5
- 4 Irwig L, Tosteson AN, Gatsonis C, Lau J, Colditz G, Chalmers TC *et al*. Guidelines for meta-analyses evaluating diagnostic tests. *Ann Intern Med* 1994;**120**:667–76
- 5 Deville WL, Buntinx F, Bouter LM. Conducting systematic reviews of diagnostic studies: didactic guidelines. *BMC Med Res Methodol* 2002;**2**:9–21
- 6 Agrup C, Luxon LM. Immune-mediated inner-ear disorders in neuro-otology. *Curr Opin Neurol* 2006;**19**:26–32
- 7 Soliman AM. Immune-mediated inner ear disease. *Am J Otol* 1992;**13**:575–9
- 8 Ryan AF, Harris JP, Keithley EM. Immune-mediated hearing loss: basic mechanisms and options for therapy. *Acta Otolaryngol Suppl* 2002;**548**:38–43
- 9 Veldman J. Immune-mediated sensorineural hearing loss. *Auris Nasus Larynx* 1998;**25**:309–17
- 10 Barna BP, Hughes GB. Autoimmune inner ear disease – a real entity? *Clin Lab Med* 1997;**17**:581–94
- 11 Plester D, Soliman AM. Autoimmune hearing loss. *Am J Otol* 1989;**10**:188–92
- 12 Hughes GB, Barna BP, Kinney SE, Calabrese SH, Nalepa NL. Predictive value of laboratory tests in “autoimmune” inner ear disease: preliminary report. *Laryngoscope* 1986;**96**:502–5
- 13 Hughes GB, Moscicki R, Barna BP, San Martin JE. Laboratory diagnosis of immune inner ear disease. *Am J Otol* 1994;**15**:198–202
- 14 Harris JP. Autoimmunity of the inner ear. *Am J Otol* 1989;**10**:193–5
- 15 Soliman AM. Experimental autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope* 1989;**99**:188–93
- 16 Veldman JE. Immunology of hearing: experiments of nature. *Am J Otol* 1989;**10**:183–7
- 17 Harris JP, Heydt J, Keithley EM, Chen MC. Immunopathology of the inner ear: an update. *Ann NY Acad Sci* 1997;**830**:166–78
- 18 Ruckenstein MJ, Milburn M, Hu L. Strial dysfunction in the MRL-Fas mouse. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;**121**:452–6
- 19 García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Zurita M, de la Fuente R, Lobo D. Controversies and criticisms on designs for experimental autoimmune labyrinthitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;**113**:404–10
- 20 Yoo TJ, Tomoda K, Stuart JM, Cremer MA, Townes AS, Kang AH. Type II collagen –induced autoimmune sensorineural hearing loss and vestibular dysfunction in rats [in Italian]. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1983;**92**:267–71
- 21 Cadoni G, Fetoni AR, Agostino S. Role of endothelial cell autoantibodies in the pathogenesis of sudden hearing loss. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2001;**21**:138–43
- 22 Lake GM 3rd, Sismanis A, Ariga T, Yamawaki M, Gao Y, Yu RK. Antibodies to glycosphingolipid antigens in patients with immune-mediated cochleovestibular disorders. *Am J Otol* 1997;**18**:175–8
- 23 Cao MY, Dupriez VJ, Rider MH, Deggouj N, Gersdorff MC, Rousseau GG *et al*. Myelin protein Po as a potential autoantigen in autoimmune inner ear disease. *FASEB J* 1996;**10**:1635–40
- 24 Zajic G, Nair TS, Ptok M, Van Waes C, Altschuler RA, Schacht J *et al*. Monoclonal antibodies to inner ear antigens: I. Antigens expressed by supporting cells of guinea pig cochlea. *Hear Res* 1991;**52**:59–71
- 25 Ptok M, Nair TS, Altschuler RA, Schacht J, Carey TE. Monoclonal antibodies to inner ear antigens: II. Antigens expressed in sensory cell stereocilia. *Hear Res* 1991;**57**:79–90
- 26 Suzuki M, Krug MS, Cheng KC, Yazawa Y, Bernstein J, Yoo TJ. Antibodies against inner ear proteins in the sera of patients with inner-ear diseases. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1997;**59**:10–17
- 27 Hefeneider SH, McCoy SL, Hausman FA, Trune DR. Autoimmune mouse antibodies recognize multiple antigens proposed in human immune-mediated hearing loss. *Otol Neurotol* 2004;**25**:250–6
- 28 Boulassel MR, Tomasi JP, Deggouj N, Gersdorff M. Identification of β -actin as a candidate autoantigen in autoimmune inner ear disease. *Clin Otolaryngol* 2000;**25**:535–41
- 29 Nair TS, Prieskorn DM, Miller JM, Mori A, Gray J, Carey TE. In vivo binding and hearing loss after intracochlear infusion of KHRI-3 antibody. *Hear Res* 1997;**107**:93–101

- 30 García-Berrocal JR. Immunomediated inner ear disease [in Spanish]. Barcelona: Ars Medica, 2004;59–70
- 31 Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1990;**100**:319–25
- 32 Gong SS, Yu DZ, Wang JB. Relationship between three inner ear antigens with different molecular weights and autoimmune inner ear disease. *Acta Otolaryngol* 2002;**122**:5–9
- 33 Yamanobe S, Harris JP. Inner ear specific antibodies. *Laryngoscope* 1998;**103**:319–25
- 34 Cao MY, Deggoug N, Gersdorff M, Tomasi JP. Guinea pig inner ear antigens: extraction and application to the study of human autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope* 1996;**106**:207–12
- 35 Nair TS, Kozma KE, Hoefling NL, Kommareddi PK, Ueda Y, Gong TW *et al.* Identification and characterization of choline transporter-like protein 2, an inner ear glycoprotein of 68 and 72 kDa, that is the target of antibody-induced hearing loss. *J Neurosci* 2004;**18**:1772–9
- 36 Hughes GB, Barna BP, Kinney SE, Calabrese LH, Nalepa NJ. Clinical diagnosis of immune inner-ear disease. *Laryngoscope* 1988;**98**:251–3
- 37 Kanzaki J. Diagnostic criteria for acute profound deafness. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 1994;**514**:7–8
- 38 García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Millan I. Sudden presentation of immune-mediated inner ear disease: characterization and acceptance of a cochleoves-tibular dysfunction. *J Laryngol Otol* 2003;**117**:775–9
- 39 Brookes GB. Immune-complex associated deafness: preliminary communication. *J Roy Soc Med* 1985;**78**:47–55
- 40 Kempf HG, Hornig T. Immunologic findings and therapeutic results in chronic progressive inner ear hearing loss [in German]. *HNO* 1987;**35**:38–42
- 41 Hughes GB, Barna BP, Kinney SE, Calabrese LH, Nalepa NJ. Clinical diagnosis of immune inner-ear disease. *Laryngoscope* 1988;**98**:251–3
- 42 Helfgott SM, Moscicki RA, San Martin J, Lorenzo C, Kieval R, McKenna M *et al.* Correlation between antibodies to type II collagen and treatment outcome in bilateral progressive sensorineural hearing loss. *Lancet* 1991;**337**:387–9
- 43 Lejeune JM, Charachon R. Value of immunobiological tests in Meniere's disease and in rapidly progressive sensorineural deafness [in French]. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 1991;**112**:127–31
- 44 Veldman JE, Handa T, Meeuwse F. Diagnostic dilemmas in rapidly progressive sensorineural hearing loss and sudden deafness. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1993;**113**:303–6
- 45 Cotter CS, Singleton GT, Corman LC. Immune-mediated inner ear disease and parvovirus B19. *Laryngoscope* 1994;**104**:1235–9
- 46 Kanzaki J, Inoue Y, O-uchi T. Immunological findings of serological test in steroid-responsive sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1994;**514**:66–9
- 47 Moscicki RA, San Martin JE, Quintero CH, Rauch SD, Nadol JB Jr, Bloch KJ. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss. *JAMA* 1994;**272**:611–16
- 48 García-Berrocal JR, Pinilla M, Ramírez-Camacho R, González M, López-Cortijo C. Inner ear diseases of probable autoimmune origin and their response to steroid treatment [in Spanish]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1995;**46**:416–20
- 49 Rauch SD, San Martin JE, Moscicki RA, Bloch KJ. Serum antibodies against heat shock protein 70 in Meniere's disease. *Am J Otol* 1995;**16**:648–52
- 50 Disher MJ, Ramakrishnan A, Nair TS, Miller JM, Telian SA, Arts HA *et al.* Human autoantibodies and monoclonal antibody KHRI-3 bind to a phylogenetically conserved inner-ear-supporting cell antigen. *Ann N Y Acad Sci* 1997;**830**:253–65
- 51 Quaranta A, Scaringi A, Portalatini P, Vantaggiato D. Auditory findings in subjects with immunomediated sensorineural hearing loss. *Ann N Y Acad Sci* 1997;**830**:277–90
- 52 Yamawaki M, Ariga T, Gao Y, Tokuda A, Yu JS, Sismanis A *et al.* Sulfoglucuronosyl glycolipids as putative antigens for autoimmune inner ear disease. *J Neuroimmunol* 1998;**84**:111–16
- 53 Hirose K, Wener MH, Duckert LG. Utility of laboratory testing in autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope* 1999;**109**:1749–54
- 54 Zavod MB, Sataloff RT, Vijay MR. Frequency of cochlear enhancement on magnetic resonance imaging in patients with autoimmune sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;**126**:969–71
- 55 Lunardi C, Bason C, Leandri M, Navone R, Lestani M, Millo E *et al.* Autoantibodies to inner ear and endothelial antigens in Cogan's syndrome. *Lancet* 2002;**360**:915–21
- 56 Lorenz RR, Solares CA, Williams P, Sikora J, Pelfrey CM, Hughes GB *et al.* Interferon- γ production to inner ear antigens by T cells from patients with autoimmune sensorineural hearing loss. *J Neuroimmunol* 2002;**130**:173–8
- 57 García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Vargas JA, Millan I. Does the serological testing really play a role in the diagnosis immune-mediated inner ear disease? *Acta Otolaryngol* 2002;**122**:243–8
- 58 Cadoni G, Fetoni AR, Agostino S, De Santis A, Manna R, Ottaviani F *et al.* Autoimmunity in sudden sensorineural hearing loss: possible role of anti-endothelial cell autoantibodies. *Acta Otolaryngol* 2002;**548**:30–3
- 59 García Callejo FJ, Marco Algarra J, Martínez Beneyto MP, Orts Alborch MH, Morant Ventura A. Autoimmune identification of sudden hearing loss. *Acta Otolaryngol* 2003;**123**:168–71
- 60 Mazlumzadeh M, Lowe VJ, Mullan BP, Fabry DA, McDonald TJ, Matteson EL. The utility of positron emission tomography in the evaluation of autoimmune hearing loss. *Otol Neurotol* 2003;**24**:201–4
- 61 Loveman DM, de Comarmond C, Cepero R, Baldwin DM. Autoimmune sensorineural hearing loss: clinical course and treatment outcome. *Semin Arthritis Rheum* 2004;**34**:538–43
- 62 Zeitoun H, Beckman JG, Arts HA, Lansford CD, Lee DS, El-Kashlan HK *et al.* Corticosteroid response and supporting cell antibody in autoimmune hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;**131**:665–72
- 63 Zamora J, Abaira V, Muriel A, Khan K, Coomarasamy A. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data. *BMC Med Res Methodol* 2006;**6**:31–42
- 64 Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, Glas AS, Bossuyt PM, Kleijnen J. Sources of variation and bias in studies of diagnostic accuracy: a systematic review. *Ann Intern Med* 2004;**140**:189–202
- 65 Munari L, Charchat S, Rodrigues L, von Muhlen CA, Bau AR, Lavinsky L *et al.* An ELISA serum assay for autoantibodies to HSP70 in immune-mediated hearing loss. *J Immunol Methods* 2003;**283**:155–61
- 66 García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Arellano B, Vargas JA. Validity of the Western blot immunoassay for heat shock protein-70 in associated and isolated immunorelated inner ear disease. *Laryngoscope* 2002;**112**:304–9
- 67 Goehring C, Perrier A, Morabia A. Spectrum bias: a quantitative and graphical analysis of the variability of medical diagnostic test performance. *Stat Med* 2004;**15**:23:125–35
- 68 Mulherin SA, Miller WC. Spectrum bias or spectrum effect? Subgroup variation in diagnostic test evaluation. *Ann Intern Med* 2002;**137**:598–602
- 69 Read MC, Lachs MS, Feinstein AR. Use of methodological standards in diagnostic test research: getting better but still not good. *JAMA* 1995;**274**:645–51
- 70 Broughton SS, Meyerhoff WE, Cohen SB. Immune-mediated inner ear disease: 10-year experience. *Semin Arthritis Rheum* 2004;**34**:544–8
- 71 Lasak JM, Sataloff RT, Hawkshaw M, Carey TE, Lyons KM, Spiegel JR. Autoimmune inner ear disease: steroid and cytotoxic drug therapy. *Ear Nose Throat J* 2001;**80**:808–18
- 72 Ruckenstein MJ. Autoimmune inner ear disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;**12**:426–30

- 73 Harris JP, Weisman MH, Derebery JM, Espeland MA, Gantz BJ, Gulya AJ *et al.* Treatment of corticosteroid-responsive autoimmune inner ear disease with methotrexate: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;**290**:1875–83
- 74 Cohen S, Shoup A, Weisman MH, Harris J. Etanercept treatment for autoimmune inner ear disease: results of a pilot placebo-controlled study. *Otol Neurotol* 2005;**26**: 903–7
- 75 Lobo D, Trinidad A, García-Berrocal JR, Verdaguer JM, Ramírez-Camacho R. TNF alpha blockers do not improve the hearing recovery obtained with glucocorticoid therapy in an autoimmune experimental labyrinthitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006;**263**:622–6

Address for correspondence:
Dr David Lobo,
Hospital Universitario Puerta de Hierro,
Universidad Autónoma de Madrid,
San Martín de Porres 4 28035,
Madrid, Spain.

Fax: + 34913730535
E-mail: d.lobo@excite.com

Dr D Lobo takes responsibility for the integrity of the
content of the paper.
Competing interests: None declared

ANEXO IV

ORIGINAL ARTICLE

Immunologic work-up study for inner ear disorders: Looking for a rational strategy

JOSÉ RAMÓN GARCÍA-BERROCAL¹, ALMUDENA TRINIDAD¹, RAFAEL RAMÍREZ-CAMACHO¹, DAVID LOBO¹, JOSÉ MARÍA VERDAGUER² & ANDRÉS IBÁÑEZ¹

Departments of Otorhinolaryngology, ¹Hospital Universitario Puerta de Hierro and ²Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Conclusions. For the evaluation of a patient with suspected immune-mediated inner ear disease (IMIED), an exhaustive immunologic work-up study is not recommended if financial resources are limited. Analysis of antinuclear antibodies (ANA) and the immunophenotype of peripheral blood lymphocytes (PBL) proved to be the most useful tests in our population to support the clinical diagnosis of IMIED. **Objective.** Owing to the lack of specific serological markers for the diagnosis of IMIED, an exhaustive immunologic work-up study for patients with suspected IMIED is usually performed. The aim of this study was to estimate the use of resources and the costs involved in the routine laboratory tests used for the diagnosis of IMIED. **Material and methods.** This was a comparative study of two groups of patients with a high suspicion of diverse clinical forms of IMIED who were subjected to different serologic test designs. The cost of the classical immunologic work-up study used for the diagnosis of IMIED ($n=125$) was estimated in comparison with that of a more restricted examination, based on a recently reported high-risk profile, involving the analysis of ANA and PBL ($n=57$). **Results.** The diagnostic efficiency of the two protocols was similar. The cost of a complete immunologic work-up study was €241.77 and that of the limited analysis was €53.12.

Keywords: Antinuclear antibodies, cost, immune inner ear disease, lymphocytes, serological tests

Introduction

Since the first report of autoimmune hearing loss by McCabe [1], who based his findings on clinical data, abnormal immunologic test results and the response to immunosuppressive therapy, evidence has accumulated to support the condition. Immune-mediated inner ear disease (IMIED) has several forms of clinical presentation: as an isolated disorder with negative laboratory test results; as an isolated disorder with positive laboratory test results; and as the first manifestation of a systemic autoimmune disease with a clinical evolution that is either dependent or independent of the primary disorder [2,3]. At initial presentation it may present in a similar fashion to idiopathic sudden sensorineural hearing loss (SSNHL). During the first months of evaluation it may closely mimic the clinical presenta-

tion of Ménière's disease (MD), albeit with a more aggressive course [4].

Although IMIED can present as the sole manifestation of a systemic autoimmune disease, many attempts have been made to develop inner ear-specific assays in order to find a diagnostic marker for isolated IMIED. Diverse immunological tests are used in clinical investigation and diagnosis and to form the basis for an immunological therapeutic decision.

As the search for the identity of the specific antigenic target in IMIED remains inconclusive, we recently reported [5,6] the profile of a typical patient with IMIED, including the clinical course, immunological changes and response to steroid therapy. On the basis of a limited immunologic work-up study, we estimate herein the cost of diagnosing IMIED.

Correspondence: José Ramón García-Berrocal, MD, PhD, Department of Otorhinolaryngology, Puerta de Hierro Hospital, San Martín de Porres 4, ES-28035 Madrid, Spain. Tel: +34 1 3162240, ext. 5409. Fax: +34 1 3730535. E-mail: jrgarciab@yahoo.com

(Received 20 January 2005; accepted 23 March 2005)

ISSN 0001-6489 print/ISSN 1651-2551 online © 2005 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/00016480510038059

Material and methods

A retrospective case series study was performed to estimate the cost of a previously reported immunologic work-up study [2] which was extended to 57 new patients who presented with either SSNHL, progressive SNHL (PSNHL) or fluctuating SNHL (FSNHL) punctuated by episodes of vertigo, tinnitus and aural fullness between May 2002 and May 2004. This group of patients was compared with a group of 125 patients reported in 2002 [2]. The clinical evaluation included a routine history and physical examination, a pure-tone audiogram, syphilis tests and a limited immunologic work-up study. An imaging study (MRI) was performed to rule out abnormalities of the eighth cranial nerve.

The previous immunologic work-up study included determination of the erythrocyte sedimentation rate (ESR), antinuclear autoantibodies (ANA), serum immunoglobulins IgG, IgA and IgM, complement factors C3 and C4, heat shock protein 70 (HSP 70; OtoBlot™; IMCO Diagnostics, Buffalo, NY) and the phenotype of peripheral blood lymphocytes (PBL) using 3-color flow cytometry. The patients were compared with 14 healthy control subjects (9 males, 5 females; mean age 36 years). The present immunologic study was restricted to the determination of ANA and the phenotype of PBL based on the previously reported results [2], as confirmed in recent publications [5,6].

All patients gave their informed consent before the withdrawal of blood samples. The tests were carried out prior to the start of steroid therapy with 6-methylprednisolone. The costs of the different tests were estimated in Euros (1€ = 1.33 USD as of April 25 exchange rate 1€ = 1.29 USD) [7–9].

SSNHL

Forty new patients (13 males, 27 females; mean age 35.05 years; age range 15–70 years) with SSNHL were compared with 77 previously reported patients [2].

The patients in this group had a high suspicion of immunologic disease due to the existence of known systemic autoimmune disease, bilateral or recurrent disease and because they were young adults. A number of patients were excluded because of the following criteria: age >65 years; vascular risk factors [diabetes mellitus, hypertension, thromboembolic disease, atherosclerotic disease, hypercoagulation states, migraine and high levels of total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol]; intracranial hemorrhage; infarction; and vertebral insufficiency.

After immunologic work-up, the following criteria were applied to support a high suspicion of IMIED [5,6]:

- Major criteria: bilaterally affected; presence of systemic autoimmune disease; ANA titer >1:80; reduced number of naive T cells (CD4RA); and a hearing recovery rate >80%.
- Minor criteria: unilaterally affected; young/middle-aged patient; female gender; and a positive response to steroid treatment (recovery rate <80%).

The presence of three major criteria or two major criteria plus two minor criteria supported the suspicion of an immune-mediated disorder, taking into account the fact that patients with profound hearing losses (>90 dB) show a low recovery rate, regardless of the etiology.

Patients were treated with 6-methylprednisolone at a starting dose of 1 mg/kg/day; this therapy was tapered during the next 21 days. In patients with profound hearing loss (>70 dB), 3 bolus doses of 6-methylprednisolone (500–1000 mg/day) were administered.

PSNHL

The diagnosis of PSNHL was based on criteria reported by Moscicki et al. [10]. Eight new patients (3 males, 5 females; mean age 38.2 years; age range 21–49 years) were compared with 31 previously studied patients [2].

FSNHL

Nine new patients with FSNHL (5 males, 4 females; mean age 45.3 years; age range 28–71 years) with a diagnosis of MD as defined by the American Academy of Otolaryngology—Head and Neck Surgery [11] were compared with 17 patients studied 2 years previously [2].

Patients affected by PSNHL and FSNHL were subjected to oral administration of 6-methylprednisolone at a starting dose of 1 mg/kg/day; this therapy was tapered during the next 21 days. Sera were only stored for a variable period to determine the immunophenotype of PBL by means of three-color flow cytometry.

For patients affected by PSNHL and FSNHL, an immune-mediated etiology was suspected when two of the following criteria were observed: a positive response to corticosteroids; the existence of ANA (titer >1:80); and a diagnosis of systemic autoimmune disease.

Results

After application of the new test battery, 29 patients (50.8%) [20 (50%) with SSNHL, 3 (37.5%) with PSNHL and 6 (66.6%) with FSNHL] were considered steroid-responsive. A similar percentage of patients (47.2%) was observed in the previous study. Thirty-one patients (24.8%) in the previous study and 15 (26.3%) in the present analysis were considered to have an autoimmune etiology. A comparison between the two subgroups of patients with a positive response to steroids is shown in Table I. It can be seen that some tests, such as detection of HSP 70 or determination of the ESR, showed a low index of positivity in the previous study. Therefore, these tests were not performed in the present study. However, determination of ANA and the immunophenotype of PBL showed a high index of positivity. Finally, similar percentages of patients were considered to have IMIED in accordance with the post-treatment criteria in both series, in spite of the restricted immunologic work-up study performed in the later group.

The costs of the different tests are shown in Table II. The cost of a complete immunologic work-up study was €241.77. When only the most cost-effective tests (determination of ANA and the immunophenotype of PBL) were used, the cost fell to €53.12.

Discussion

IMIED represents a clinical entity which is very difficult to diagnose. It includes clinical conditions associated with rapidly progressive forms of SNHL. The difficulty of finding patients with progressive deafness using the criteria of Moscicki et al. [10] forces us to question the different forms of presentation of autoimmune deafness. In our experience, the most frequent form of presentation is sudden deafness, which over time behaves as a fluctuating

Table II. Costs of the tests included in the previous study [2].

Test	Cost (€) ^a
Complete blood count	18.08
ESR	15.60
ANA	22.55
IgA, IgG, IgM	16.54
Western Blot for HSP 70	41.47
Immunophenotype of PBL	30.56
Complement factors C3 and C4	41.35
FTA	55.60
Audiogram	90.22
MRI	676.69
Total cost	1008.66

^a1€ = 1.29 USD as of April 25.

hearing loss similar to MD. As SSNHL may have multiple etiologies, we only performed an immunologic work-up study in those patients in whom there was a strong suspicion of IMIED. Although the presence of bilateral disease suggests an immunologic origin, SSNHL is extremely uncommon. Moreover, it has been reported [12] that bilateral SSNHL mainly affects the elderly, and most cases correspond to a vascular etiology. Therefore, age >65 years and risk factors for cardiovascular disease (i.e. high blood pressure, diabetes mellitus) were considered exclusion criteria for performance of the immunological tests.

A systemic autoimmune disorder is present in less than one-third of IMIED cases. Other features suggestive of an immune-mediated etiology include a positive response to corticosteroid therapy and positive screening tests. The lack of a specific serological marker for IMIED has led researchers to focus on identifying an antigen that triggers the immune mechanisms and, consequently, the inner ear tissue injury.

Although many serum rheumatologic tests are available, their overuse can result in diagnostic confusion and increased costs. Based on the existence of autoantibodies against inner ear antigens,

Table I. Comparative analysis of steroid-responsive subgroups of patients considering the diverse criteria used for the immunologic study. Values shown represent numbers of patients, with percentages in parentheses.

Group	ANA titer >1:80	CD4CD45RA <17%	Systemic autoimmune disease	HSP 70	Elevated ESR	IMIED
SSNHL						
Previous study [2] (n=45)	15 (33.3)	26 (57.7)	4 (8.8)	1 (2.2)	3 (6.6)	26
This study (n=20)	10 (50)	8 (40)	3 (15)	NP	NP	11
PSNHL						
Previous study [2] (n=8)	4 (50)	3 (37.5)	0	0	0	4
This study (n=3)	2 (66.6)	2 (66.6)	1 (33.3)	NP	NP	2
FSNHL						
Previous study [2] (n=6)	1 (16.6)	2 (33.3)	0	1 (16.6)	0	1
This study (n=6)	1 (16.6)	3 (50)	1 (16.6)	NP	NP	2

NP = not performed.

the pathogenesis of certain forms of sudden hearing loss is suggested to be of an autoimmune nature. The presence of antiendothelial antibodies, as recently reported [13] in patients with sudden hearing loss, supports the hypothesis of immune-mediated vascular damage. Controversial results were reported in more extensive studies [8,14] in which ANA, rheumatoid factor, antimitochondrial autoantibodies, antibodies against smooth muscle, anti-sarcomal antibodies, anti-laminin antibodies and antibodies against type II collagen were investigated. On the basis of these serological findings we only included the ANA test in our immunology work-up laboratory test battery. As a result of this decision, we have reduced costs. The ANA and rheumatoid factor tests are slightly more specific as they measure immunoglobulins; however, the particular focus of the measured antibody is not revealed [6]. The detection of autoantibodies is not always associated with disease and autoantibodies present in patients with autoimmune disease can also be found in healthy people. The approximate incidence of positive ANA is 5% in the general normal population, 40% in the normal elderly population and 25% in healthy relatives of patients with systemic lupus erythematosus (SLE). The incidence of positive ANA in various diseases is as follows: SLE, 99%; Sjögren's syndrome, 50–65%; and rheumatoid arthritis, 12–24%. As the ANA titer increases, the test becomes more disease-specific. ANA titers of $\leq 1:40$ are considered negative. Titers of 1:80 are found in 15% of the normal, healthy population. Only 5% of the general population show a titer of 1:180. Even higher titers are often clinically insignificant in patients aged >60 years. These values are influenced by the prevalence of the disease in the population; as the prevalence of IMIED is low, the positive predictive value of the test will be low. Therefore, ultimately, the ANA result must be interpreted in the specific context of an individual patient's symptoms and other test results, as it may or may not be significant in a particular individual. In our opinion, the low mean age of our patients and the ANA titers considered (1:80) validate this finding in the context of a high-risk profile patient, as proposed previously [2,4,5].

A complement activation study may help to identify patients with immune-mediated sudden deafness. Owing to its inflammatory effect of complement, it can also contribute to tissue destruction in a variety of autoimmune and inflammatory diseases not necessarily caused by infective agents. Although elevated levels of C3bc have been detected in patients with sudden deafness [15], arousing the suspicion of an immune-mediated etiology and, consequently, identifying patients who would benefit

from treatment with anti-inflammatory drugs, we have not observed these findings in our investigations. Likewise, a patient with an autoimmune disease may have elevated, depressed or normal levels of complement factors (C3, C4, CH50), depending on when serum is tested during the course of the illness.

The ESR is a non-specific indicator of inflammation. It is a diagnostic criterion in polymyalgia rheumatica and temporal arteritis. However, the specificity of an elevated ESR is quite low, limiting its use as a diagnostic test. ESR values tend to correlate with disease activity in rheumatoid arthritis and may be useful for monitoring the therapeutic response. The low number of patients with an elevated ESR observed in our previous studies limits the utility of this serological marker.

Attempts to find a specific diagnostic marker for autoimmune inner ear disease were initially promising. An anti-68-kDa autoantibody in the sera of patients with rapidly progressive SNHL was demonstrated by Western blot analysis [16]. Evidence linking the 68-kDa antigen with highly inducible HSP 70 was reported [17]. However, it was shown in recent reports [18,19] that the frequency of antibodies to HSP substrates did not differ between patients and controls and so we have stopped performing this test. Hence, although Western blotting was suggested to have the ability to predict the treatment response, no correlation between the level of antibodies and hearing recovery has been established [20].

Flow cytometry has been incorporated in the immunologic work-up with the objective of demonstrating alterations in T-cell subpopulations, facilitating diagnosis. Our investigations [2,4,8] showed decreased numbers of both CD4+ helper cells and naive T cells (CD4+CD45RA+) in patients affected by SSNHL. The decrease in the number of CD4CD45RA cells could be due to the presence of autoantibodies to CD45RA molecules, the in vivo conversion of naive cells to memory cells as the result of an ongoing immunologic response, viral infection of these cells or a preferential homing of naive cells to focal inflammatory sites in the inner ear.

In conclusion, for the evaluation of a patient with suspected IMIED, determination of ANA and the immunophenotype of PBL proved more useful than determination of the ESR and C3 and C4 or Western blotting for HSP 70 in our population. We also recommend a thorough history and complete otolaryngologic physical examination, followed routinely by an MRI scan and the determination of fluorescent treponemal antibody, although these tests increase the final cost of the evaluation. Prompt

treatment with corticosteroids and other immunosuppressive agents can preserve hearing and vestibular function, whereas a delay in diagnosis may lead to fibrosis and ossification inside the cochlea which requires cochlear implantation to recover hearing, with a considerable increase in cost (to almost €16 541.35). In order to avoid this undesirable situation, further investigations to identify the immunologic target inside the inner ear and new therapeutic agents that act on different arms of the immune system, minimizing adverse effects, are required.

References

- [1] McCabe BF. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979;88:585–9.
- [2] García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Vargas JA, Millan I. Does the serological testing really play a role in the diagnosis of immune-mediated sensorineural hearing loss? *Acta Otolaryngol* 2002;122:243–8.
- [3] García-Berrocal JR, Vargas JA, Vaquero M, Ramón y Cajal S, Ramírez-Camacho RA. Cogan's syndrome: an oculo-audiovestibular disease. *Postgrad Med J* 1999;75:262–4.
- [4] Ruckenstein MJ. Autoimmune inner ear disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;12:426–30.
- [5] García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Millan I, Górriz C, Trinidad A, Arellano B, et al. Sudden presentation of immune-mediated inner ear disease: characterization and acceptance of a cochleovestibular dysfunction. *J Laryngol Otol* 2003;117:775–9.
- [6] García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Sudden sensorineural hearing loss: supporting the immunologic theory. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:989–97.
- [7] Sabini P, Sclafany AP. Efficacy of serological testing in asymmetric sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;112:469–76.
- [8] García-Berrocal JR, Pinilla Urraca M, Ramírez-Camacho R, Gonzalez Martin F, López-Cortijo C, et al. Patología de oído interno de probable origen autoinmune y su respuesta al tratamiento esteroideo. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1995;46:416–20.
- [9] García-Berrocal JR, Vargas JA, Ramírez-Camacho RA, Gonzalez FM, Gea-Banacloche JC, Vergara J, et al. Deficiency of naive T cells in patients with sudden deafness. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:712–7.
- [10] Moscicki RA, San Martin JE, Quintero CH, Rauch SD, Nadol JB, Bloch KJ, et al. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss. *JAMA* 1994;272:611–6.
- [11] Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:181–5.
- [12] Fatterman BL, Luxford WM, Saunders SE. Sudden bilateral sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1996;106:1347–50.
- [13] Ottaviani F, Cadoni G, Marinelli L, Fetoni AR, De Santis A, Romito A, et al. Anti-endothelial autoantibodies in patients with sudden hearing loss. *Laryngoscope* 1999;109:1084–7.
- [14] Yoshida Y, Yamauchi S, Shinkawa A, Horiuchi M, Sakai M. Immunological and virological study of sudden deafness. *Auris Nasus Larynx* 1996;23:63–8.
- [15] Nordang L, Laurent C, Mollnes TE. Complement activation in sudden deafness. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:633–6.
- [16] Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1990;100:516–24.
- [17] Billings PB, Keithley EM, Harris JP. Evidence linking the 68 kilodalton antigen identified in progressive sensorineural hearing loss patient sera with heat shock protein 70. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:181–8.
- [18] García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Arellano B, Vargas JA. Validity of the Western blot immunoassay for heat shock protein 70 in associated and isolated immuno-related inner ear disease. *Laryngoscope* 2002;112:304–9.
- [19] Yeom K, Gray J, Nair TS, Arts HA, Telian SA, Disher MJ, et al. Antibodies to HSP-70 in normal donors and autoimmune hearing loss patients. *Laryngoscope* 2003;113:1770–6.
- [20] García Callejo FJ, Velert Vila MM, Laporta P, Orts Alborch MH, De Paula Vernetta C, Marco Algarra J. Titulación de anticuerpos anticocleares mediante Western-blot y grado de recuperación auditiva tras corticoterapia en pacientes con sordera súbita. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2004;55:463–9.

ANEXO V

CONTROVERSIES AND CRITICISMS ON DESIGNS FOR EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE LABYRINTHITIS

JOSÉ RAMÓN GARCÍA-BERROCAL, MD, PHD
ALMUDENA TRINIDAD, MD
RAQUEL DE LA FUENTE, MD

RAFAEL RAMÍREZ-CAMACHO, MD, PHD
MERCEDES ZURITA, BSC, PHD
DAVID LOBO, MD

MADRID, SPAIN

Although immune-mediated inner ear disease was reported around 25 years ago, numerous attempts to identify the inner ear antigens have been performed. Experimental animal models have been used to study the immune mechanisms involved in hearing loss and to develop new therapies. Because animal models of autoimmune labyrinthitis have been developed by means of different antigens, we cannot yet show a valid immunopathologic explanation. A critical analysis of the more relevant experimental models employed has been performed in order to validate the methodology. Comparison between these models and animals with spontaneous systemic autoimmune disease has raised more questions concerning the pathophysiology of autoimmune hearing loss. A new pathogenetic theory is suggested, involving the supporting cells of the organ of Corti.

KEY WORDS — autoimmunity, experimental animal model, hearing loss, supporting cell.

INTRODUCTION

Immune-mediated inner ear disease includes clinical conditions associated with rapidly progressive forms of sensorineural hearing loss. Although nearly 25 years has elapsed since the McCabe report,¹ the lack of well-defined detection methods to identify immune-mediated processes within the inner ear and the fact that the human inner ear is not amenable to diagnostic biopsy have generated an increasing interest in developing animal models to clarify the underlying mechanisms of these entities and improve therapies for them.

Experimental animal models of autoimmune labyrinthitis (experimental autoimmune labyrinthitis; EAL) support the existence of different immune responses inside the inner ear, providing indirect evidence for the diagnosis of autoimmune inner ear disease. Placing antigens into the inner ear leads to sensitization of systemic immunity. If animals are systemically sensitized to an antigen and that antigen is later placed in the inner ear, a strong secondary immune response results with severe hearing loss. However, the utility of the experimental protocols of EAL can be questionable, given the contradictory results shown in multiple reports.²⁻⁴ The inflammatory response within the cochlea can be mild and transient or can lead to the formation of fibro-osseous tissue that fills the scalae and leads to nonreversible hearing loss. Controversies regarding the substance used

in the immunization protocol and the pathological findings have made necessary the reexamination of some EAL designs in order to clarify questions concerning the pathophysiological mechanisms involved (Fig 1). A critical reexamination of diverse sensitization protocols employed to establish diverse models of EAL was the objective of the present study.

MATERIALS AND METHODS

One hundred female Hartley guinea pigs (300 g weight) were included in the present study.^{2,3} The animals were handled according to the National

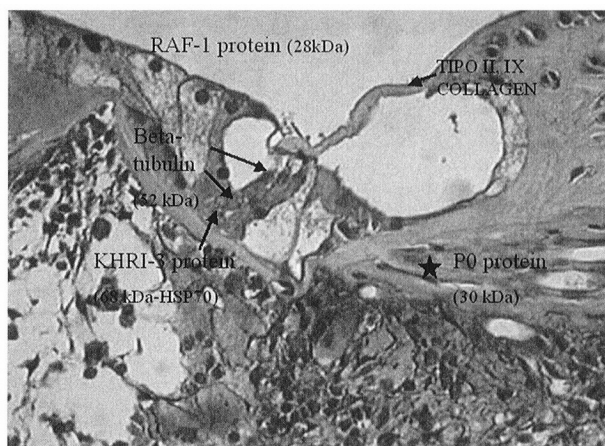


Fig 1. Cochlear section of animal included in sterile labyrinthitis model shows most frequent antigens presumed to be involved in immune-mediated inner ear disease.

From the Service of Otorhinolaryngology (García-Berrocal, Ramírez-Camacho, Trinidad, de la Fuente, Lobo) and the Neurosciences Department (Zurita), Hospital Universitario Puerta de Hierro, Autónoma University, Madrid, Spain. This work was partially financed by grants 93/0264 and 00/0213 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Spain.

CORRESPONDENCE — José Ramón García-Berrocal, MD, PhD, Servicio de Otorrinolaringología, Clínica Puerta de Hierro, San Martín de Porres 4, 28035 Madrid, Spain.

Council for the Care of Laboratory Animals guidelines. Ear examination by microscope and Preyer's reflex was performed before each phase of the different experimental protocols.

EXPERIMENTAL DESIGN

Sterile Labyrinthitis Group. Twenty animals were immunized subcutaneously with 1 mg of keyhole limpet hemocyanin (KLH; Sigma) in 100 μ L of complete Freund's adjuvant (CFA; Sigma Aldrich, Madrid, Spain) and boosted intradermally with 1 mg of KLH in 100 μ L of incomplete Freund's adjuvant (IFA; Sigma Aldrich) after 2 weeks. One week after this immunization, a microhole was drilled into the scala tympani in the basal turn of the right cochlea and 1,000 mg of KLH was perfused slowly into the perilymphatic compartment with a Hamilton syringe. After perfusion, the hole was sealed with bone wax and the operative site was closed.

Controls ($n = 10$) were immunized subcutaneously with 0.2 mL of CFA in 0.2 mL of phosphate-buffered saline solution (PBS) and boosted after 2 weeks with 0.2 mL of IFA in 0.2 mL of PBS. After a week, 25 μ L of PBS was perfused through the cochlear hole into the scala tympani in the basal turn.

We gave 10 animals a unique immunization with KLH inside the cochlea in order to analyze the primary response of the inner ear to an antigen injection.

The spiral modiolar vein (SMV) was only studied in the basal turn of the cochlea. Approximately 4 to 8 sections were studied in each cochlea. In each section, the vascular diameter (in micrometers) and the endothelial vascular area (in square micrometers) were determined by image morphometry in order to avoid subjective grading scores (Optimas 6.2 software package Optimas Corporation, Bothell, Washington).

Type II Collagen Group. Twenty guinea pigs were intradermally injected (into the footpads) with 500 μ g of bovine type II collagen (collagen acid soluble from bovine nasal septum, Sigma Aldrich) in 0.1 mL of CFA in 200 μ L of PBS. All of the animals were boosted with 500 μ g of bovine type II collagen emulsified with IFA on the seventh day.

Controls ($n = 10$) were immunized into the footpads with 0.1 mL of CFA in 0.2 mL of PBS and boosted after 1 week with 0.1 mL of IFA in 0.2 mL of PBS.

Homologous Inner Ear Antigen Group. The inner ear antigen was obtained from 20 guinea pigs. The animals were deeply anesthetized with Nembutal (3 mg/100 g of body weight) and rapidly decapitated, and both tympanic bullae were extracted. The mem-

branous labyrinth (cochlear component) was obtained after removing the bony walls of both bullae. The inner ear tissue was harvested, suspended in cold PBS, homogenized by an ultrasonic cell destroyer using interrupted bursts of short duration and avoiding foaming, centrifuged 3 times at 3,000 rpm for 5 minutes at 4°C with cold distilled water, redissolved, and lyophilized to obtain a dry weight of the inner ear antigen.

Twenty guinea pigs were immunized with 140 to 200 μ g dry weight of the antigen dissolved in 0.2 mL of PBS and emulsified with an equal volume of CFA. The fresh emulsion was injected intradermally into the abdominal wall in multiple sites to avoid a granulomatous reaction. The animals were boosted twice (3 and 7 weeks) with 59 to 100 μ g dry weight of the antigen.

Controls ($n = 10$) were immunized subcutaneously with 0.2 mL of CFA in 0.2 mL of PBS and boosted after 3 and 7 weeks with 0.2 mL of IFA in 0.2 mL of PBS.

PATHOLOGICAL STUDY

The animals were painlessly sacrificed 1 week after the immunization protocol was finished. They were anesthetized (inhaled isoflurane) and systemically perfused with 4% paraformaldehyde (pH 7.2 to 7.4). The cochleas were removed, immersed in fixative for 3 hours, decalcified in ethylenediamine-tetraacetic acid for 1 to 2 weeks, dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin. The embedded cochleas were serially sectioned (5 μ m) parallel to the modiolus, deparaffinized, and stained for conventional light microscopy (hematoxylin and eosin).

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

For immunostaining to detect the presence of macrophages (ED-1, MAB 1435, Chemicon, Madrid), histologic sections from paraffin-embedded samples were mounted on glass slides and were deparaffinized by treatment in xylene for 15 minutes. Then, the sections were trypsinized for 15 minutes and rinsed in PBS. The slides were then washed in citrate-buffered solution (pH 6.0) for 10 minutes in a microwave oven, and then placed in hydrogen peroxide 3% in methanol for 15 minutes in order to block endogenous peroxidase activity. Then, the sections were immersed in PBS. The primary anti-ED-1 (1:100, Chemicon) was added at 37°C for 60 minutes, and the slides were rinsed again in PBS. A 60-minute incubation with biotinylated secondary antibody at 37°C was followed by a standard PBS rinse. Another 60-minute incubation with streptavidin-peroxidase complex, at 37°C, was carried out, and then chromogen solution was added (amino-ethyl-carbazole). The slides were then

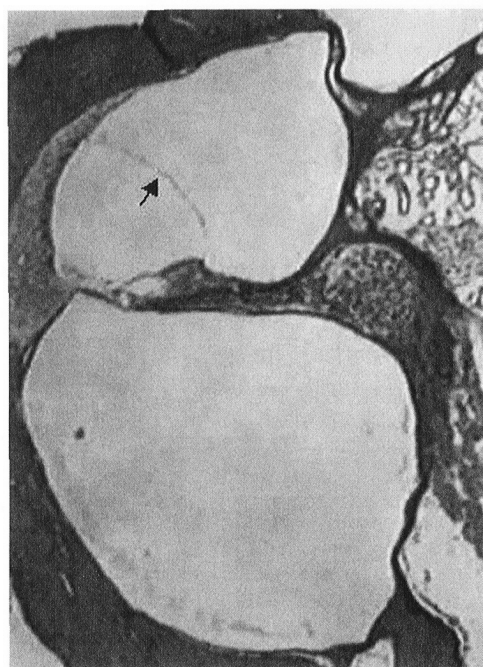


Fig 2. Endolymphatic hydrops (arrow) in animal immunized with type II collagen (H & E, original $\times 20$).

stained with hematoxylin, mounted, and examined microscopically.

HEARING ASSESSMENT

The hearing loss experimentally induced was measured by means of the auditory brain stem response (ABR) before the antigen injection and just before euthanizing the animal. Before the exploration, the animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride 100 mg/kg, diazepam 0.1 mg/kg, and atropine sulfate 0.02 to 0.04 mg/kg. Subdermal platinum-alloy needle electrodes were attached, with the active lead at the vertex and referred to a second electrode located at the tip of the nose. The ground electrode was placed on the arm muscles. Tone burst stimuli (10 μ s, 8 kHz) were delivered monaurally through a hollow ear bar. The stimuli were repeated 5 times per second with increasing intensity from 10 to 80 dB sound pressure level in 5-dB steps. A range of 375 to 1,221 trials were averaged in order to ensure that an adequate brain stem response was obtained with the Medelec Synergy System. The response that clearly demonstrated a reproducible waveform was interpreted as the threshold response.

STATISTICAL METHOD

The comparison among the groups was carried out by means of analysis of variance followed by the Newman-Keuls test for multiple comparisons.

RESULTS

In the experimental autoimmune models that used

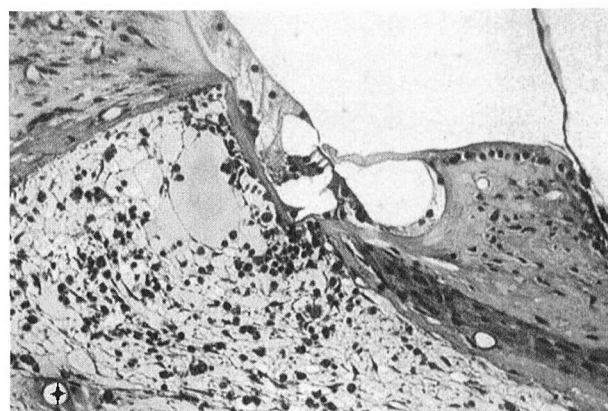
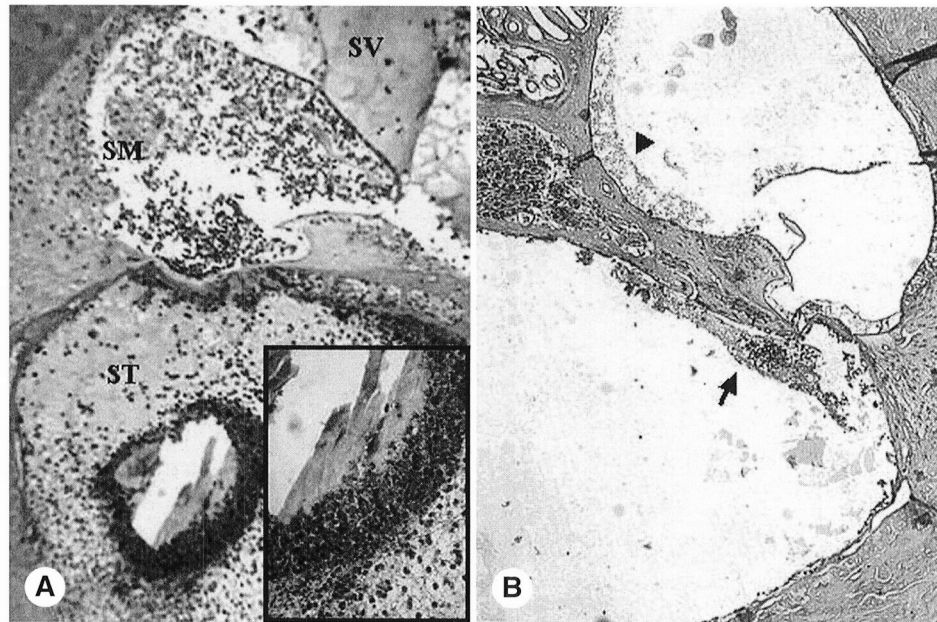


Fig 3. Fibrous reaction with vascular neoformation (star) under intact organ of Corti in animal subjected to primary cochlear immunization with keyhole limpet hemocyanin (H & E, original $\times 50$).

the homologous inner ear tissue and bovine type II collagen as antigen, neither vasculitis nor a mononuclear or polynuclear cell infiltrate was observed in the inner ear. Occasional endolymphatic hydrops was observed (Fig 2). Likewise, no hearing threshold elevations were recorded by means of the ABR study.

An extracellular matrix including fibroblasts, small blood vessels, and a connective tissue sheath was observed under an intact organ of Corti in the animals immunized with a single injection inside the cochlea (primary response; Fig 3). However, exudates, hemorrhage, and inflammation in the scala tympani extending apically from the basal turn around the injection site was only observed in the animals previously systemically sensitized with KLH (secondary response) in the sterile labyrinthitis group. In these cases, the scala media and scala vestibuli were also involved. The inflammatory cells consisted basically of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and macrophages, and were located around the SMV and the collecting venules, and in the scala tympani from the basal cochlear turn. Cochleas with severe inflammation showed endolymphatic hydrops, degenerative changes in the organ of Corti, stria vascularis, and spiral ganglion cells, a marked increase in the number of inflammatory cells in the lumen of the endolymphatic sac, and the presence of a granulomatous lesion, consisting of PMNs and macrophages, around the partially degraded KLH (Fig 4A). Immunostaining for macrophages was positive inside the granuloma. The animals from the control group only presented a nonorganized cellular infiltration within the perilymphatic space, more prominent in the scala tympani of the basal turn (Fig 4B). The SMV from the animals with a secondary response presented a significantly larger diameter (103.8 μ m) and endothelial areas (84.78 μ m²) than did the animals from the

Fig 4. A) Photomicrograph of cochlea from guinea pig immunized with keyhole limpet hemocyanin, stained by avidin-biotin-peroxidase complex method to identify macrophages inside granuloma presented in scala tympani (ST) of basal turn (original $\times 20$). SM — scala media. SV — scala vestibuli. Inset) Original $\times 100$. **B)** Mild cellular infiltration (arrow) and exudates (arrowhead) in perilymphatic spaces of control guinea pig sensitized by injection of phosphate-buffered saline solution (H & E, original $\times 20$).



control group ($75.6 \mu\text{m}$ and $44.9 \mu\text{m}^2$; $p < .05$). All of the animals with a secondary immune response showed severe hearing losses ($>85 \text{ dB}$). The controls and animals with a primary immune response had hearing losses of 25 dB .

DISCUSSION

Numerous experimental models of inner ear autoimmunity have been established to enhance our knowledge of the pathophysiology of and potential pharmacological treatments for immune-mediated inner ear disorders.⁴ The sensitization protocols employed in the experimental autoimmune models differ considerably, leading to controversies and criti-

cal reexaminations in an attempt to validate the experimental design (see Table⁵⁻¹³). Harris et al⁶ investigated the type II collagen autoimmunity model reported by Yoo et al⁵ and found no evidence of a significant hearing loss in any of the animals that were free of middle ear infections. Therefore, the morphology of the temporal bones did not differ from that of the control rats — similar to the findings in our animals. Soliman⁷ recognized a significant threshold shift ($<30 \text{ dB}$) in only 25% of the guinea pigs. Likewise, endolymphatic hydrops, mild vasculitis, and occasional spiral ganglion degeneration were sporadically and less extensively found. He also failed to detect any damage in the stria vascularis and in the organ

PATHOLOGICAL FINDINGS REPORTED IN DIFFERENT EXPERIMENTAL ANIMAL MODELS OF LABYRINTHITIS AND SYSTEMICALLY AUTOIMMUNE ANIMALS

Animal Group	Authors	Year	Pathological Findings in Inner Ear							
			Endolymphatic Hydrops	Vasculitis	Spiral Ganglion Degeneration	Cellular Infiltration	Organ of Corti Degeneration	Fibro-osseous Matrix	Granuloma	Stria Vascularis Degeneration
Type II collagen	Yoo et al ⁵	1983	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes
	Harris et al ⁶	1986	No	No	No	No	No	No	No	No
	Soliman ⁷	1990	Mild	Mild	Occasional	No	No	No	No	No
	Present study		Occasional	No	No	No	No	No	No	No
Inner ear antigen	Soliman ⁸	1989	Yes	Yes	Occasional	Mild	No	No	No	No
	Yamanobe and Harris ⁹	1992	Yes	No	Yes	Transient	No	No	No	No
	Present study		Occasional	No	No	No	No	No	No	No
Keyhole limpet hemocyanin	Woolf and Harris ¹⁰	1986	Yes	Yes	Yes	Severe	Yes	Yes	No	No
	Present study		Yes	No	Yes	Severe	Yes	Yes	Yes	No
Systemically autoimmune animals	Nariuchi et al ¹¹	1994	No	No	No	No	No	No	No	Yes
	Lin and Trune ¹²	1997	No	No	No	No	No	No	No	Yes
	Ruckenstein et al ¹³	1999	No	No	No	No	No	No	No	Yes

of Corti. However, Matsuoka et al¹⁴ reported that the direct infusion of monoclonal antibody against CB11 peptide in the cochlea also produced endolymphatic hydrops. This method of immunization is actually built upon speculation, since the fibrous reaction produced by this direct approach to the cochlea could mask or simulate an inner ear immune response. Several hypotheses could explain these controversies: the lack of antibodies against type II collagen, the presence of defective antibodies or the blockage of antibodies, and/or the absence of cellular cooperation (T cells) in the immune-mediated inner ear damage.

Soliman,⁸ using homologous crude inner ear antigen, was able to induce endolymphatic hydrops, vasculitis, mild cellular infiltration of the endolymphatic sac, and occasional spiral ganglion degeneration, and a threshold shift was seen in 20% of the tested ears. He observed a large variability in cochlear damage, not only from one animal to another, but between both cochleas of the same guinea pig and sometimes even within the different cochlear turns.

Yamanobe and Harris⁹ observed a transient cellular infiltration after a single intradermal injection of bovine inner ear antigen in CFA. The cellular infiltration and the ABR elevations resolved after day 28. These results could support the lack of pathological and electrophysiological findings of the homologous inner ear group of our study, since the repeated immunization with antigen and IFA could induce the presence of suppressor T cells. Cellular infiltration limited to the inner ear by primary sensitization with inner ear antigen (bovine membranous labyrinth) following pretreatment with cyclophosphamide in order to temporarily eliminate the suppressor T cells has been demonstrated.¹⁵ Transient cellular infiltration, mainly PMNs and lymphocytes, occurred from day 7 and peaked on day 12, and then rapidly decreased. Infiltrated cells floated in the lymphatic space and adhered to the perilymphatic partition wall. Therefore, the inflammatory cells infiltrated into the distal portion of the endolymphatic sac. These cells derived from the modiolar vein, SMV, and vessels of supratracheal and spiral ligament regions. Degeneration of the spiral ganglion cells occurred in 53% of animals, and endolymphatic hydrops occurred in 33%. More recently, with the same model, the sensitization with 55 to 65 kD proteins of the crude inner ear antigen induced the highest number of inflammatory cells, followed by the 38 to 45 kD proteins.¹⁶ Cellular infiltration induced by adoptive transfer of autoreactive T cells specific for the calcium-binding protein S-100 β has been reported.¹⁷

The sterile labyrinthitis model results in signifi-

cant cochlear pathophysiology.¹⁰ Upon exposure to antigen (challenge of the scala tympani with KLH), the inner ears of guinea pigs were capable of mounting an immune response with a rise in perilymphatic anti-KLH antibody titer. When animals were previously systemically sensitized to KLH antigen, an intense immunologic response occurred when their ears were subsequently challenged with the sensitizing antigen. The induction of labyrinthitis by means of a secondary immune response triggered by inoculation of KLH into the scala tympani in animals that had been previously systemically sensitized to this substance was accompanied by an increase in intercellular adhesion molecule-1 expression in the endothelial cells of the SMV and its collecting venules.¹⁸ This fact correlates with the histologic transformation into a high endothelial venule and with the gradual infiltration of inflammatory cells into the inner ear. This infiltration has been shown to be more intense in guinea pig-specific cytomegalovirus labyrinthitis¹⁹⁻²¹ — a fact that may be explained by the invasive capacity of these pathogens against the simple introduction of an inert exogenous material. The infiltrated inflammatory cells appear to undergo apoptosis and phagocytosis after they enter the cochlea, which continues for 3 weeks after KLH challenge. These cells are nearly cleared after 6 weeks, and the fibrotic matrix begins to calcify.²² When the material cannot be degraded by the mononuclear phagocytes, granuloma formation usually occurs.²³ The presence of PMNs and macrophages around the KLH observed in our animals represents an earlier response, as granulocytes have a short life span and disintegrate after they digest the microorganisms. The most important functional property of the macrophage is its ability to recognize and ingest foreign and damaged materials. Moreover, macrophages play an important role in the initiation and regulation of the immune response. Macrophages that produce interleukin-1 stimulate T-cell function and present antigens to lymphocytes, requiring the display of the same major histocompatibility determinants by both T cells and macrophages. In our series, this granuloma only appeared in the animals sensitized with KLH. This finding suggests that intracochlear administration provokes a more intense response.

Previous studies have shown the importance of the cellular reaction in EAL^{15,24,25} and suggest that immunocompetent cells are supplied from the systemic circulation through blood-labyrinth and blood-endolymph barriers into the endolymphatic sac, which allows these cells to proliferate locally as a local immune defense.²⁶ The presence of a granuloma inside the cochlea could represent another immune response following secondary inner ear immunostimulation

with KLH. The fact that macrophages and granulocytes appear in the endolymphatic sac before they appear in the cochlea supports the role of this organ in the immune response of the inner ear.^{27,28} However, granuloma formation can be related to the injection of a nondegrading foreign substance, ie, a foreign body granuloma, rather than an immunostimulant. Therefore, the absence of granuloma formation in the control group can be explained by the fact that PBS is a soluble, physiological fluid. Can we accept the methodology of this study? We perhaps could accept that the inner ear is capable of mounting an immune response against foreign proteins to which the immune system is previously sensitized, leading to a stronger response than simple immunization of the cochlea. But could we validate the cochlear injection? This direct approach leads to a nonspecific labyrinthitis with cellular infiltration and fibrotic tissue that does not resemble the clinical and pathophysiological features of the autoimmune diseases in humans.

Studies of spontaneous systemic autoimmune animals such as C3H/lpr, MRL-Fas/lpr and NZB/k1 mice have reported degeneration of the stria vascularis secondary to the deposition of IgG on the capillary wall with a breakdown of the blood-labyrinth barrier, although this deposition is not sufficient to induce hearing loss.¹¹⁻¹³ The lpr (lymphoproliferation) disorder is the result of a defective fas gene that allows self-recognizing T cells to proliferate and cause autoimmunity. The diseased capillaries lose their integrity at the endothelial tight junctions and the basement membrane. Serum immune complexes or antinuclear autoantibodies may be involved. The autoimmune animals have inner ear DNA receptors (endothelial cells of stria vascularis, spiral ligament, and hair cells). There is a development of antibodies to 68 to 70 kd proteins, presumed to be the DNA receptor

proteins, which is correlated with increased hearing thresholds. The down-regulation of the receptors with autoimmune disease could interfere with normal cell structure and function.²⁹ Because glucocorticoid receptors are widely located in the inner ear, with their strongest expression in the type III fibrocytes of the spiral ligament and supporting cells,³⁰ corticosteroid administration can reverse autoimmune hearing loss in these mice.³¹ Corticoids have been correlated with increased levels of sodium, potassium adenosine triphosphatase in autoimmune mice with hearing loss, and are able to restore normal concentrations of ions in the endolymph and reverse the hearing loss. However, animals that received dexamethasone treatment revealed a persistence of stria disease despite the elimination of stria antibody deposition, suggesting that genetic mechanisms may be responsible for the stria disease.³²

These studies suggest that the stria and fibrocytes of the spiral ligament could be some of the targets of autoantibodies in autoimmune hearing loss and therefore the site of steroid action to reverse the cochlear dysfunction. However, the role of the supporting cell in the pathogenesis of immune-mediated damage has been recently suggested, as these cells express Cogan's peptide³³ and the KHRI-3 antigen (68 kd cochlear protein) — immune targets that make the supporting cells vulnerable to the immune attack.^{34,35}

The absence of cellular infiltration in these autoimmune models suggests an immune complex- or IgG-mediated dysfunction of the stria vascularis, the spiral ligament, and perhaps the supporting cells, presumably involved in the support of the homeostasis of the hair cells.^{34,35} Further studies to elucidate the role of the supporting cells, T lymphocytes, and their cytokines in the pathogenesis of autoimmune hearing loss will be needed.

REFERENCES

1. McCabe BF. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979;88:585-9.
2. García Berrocal JR, Vicente J, Arellano B, González FM, Ramírez-Camacho R. Labyrinthitis experimental autoimmune: evaluación de diversos modelos en cobayas. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1997;48:5-10.
3. García Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Zurita M, Arellano B. La respuesta celular inmune precoz en la labyrinthitis experimental: estudio inmunohistoquímico. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2000;51:557-61.
4. García Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Immune response and immunopathology of the inner ear: an update. *J Laryngol Otol* 2000;114:101-7.
5. Yoo TJ, Tomoda K, Stuart JM, Cremer MA, Townes AS, Kang AH. Type II collagen-induced autoimmune sensorineural hearing loss and vestibular dysfunction in rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1983;92:267-71.
6. Harris JP, Woolf NK, Ryan AF. A reexamination of experimental type II collagen autoimmunity: middle and inner ear morphology and function. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1986;95:176-80.
7. Soliman AM. Type II collagen-induced inner ear disease: critical evaluation of the guinea pig model. *Am J Otol* 1990;11:27-32.
8. Soliman AM. Experimental autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope* 1989;99:188-93.
9. Yamanobe S, Harris JP. Spontaneous remission in experimental autoimmune labyrinthitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992;101:1007-14.
10. Woolf NK, Harris JP. Cochlear pathophysiology associated with inner ear immune responses. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1986;102:353-64.
11. Nariuchi H, Sone M, Tago C, Kurata T, Saito K. Mecha-

- nisms of hearing disturbance in an autoimmune model mouse NZB/kl. *Acta Otolaryngol Suppl* (Stockh) 1994(suppl 514):127-31.
12. Lin DW, Trune DR. Breakdown of stria vascularis blood-labyrinth barrier in CH3/lpr autoimmune disease mice. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;117:530-4.
 13. Ruckenstein MJ, Milburn M, Hu L. Strial dysfunction in the MRL-Fas mouse. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;121:452-6.
 14. Matsuoka H, Kwon SS, Yazawa Y, Barbieri M, Yoo TJ. Induction of endolymphatic hydrops by directly infused monoclonal antibody against type II collagen CB11 peptide. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:587-92.
 15. Tomiyama S, Jinnouchi K, Ikezono T, Pawankar R, Yagi T. Experimental autoimmune labyrinthitis induced by cell-mediated immune reaction. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 1999;119:665-70.
 16. Tomiyama S. Experimental autoimmune labyrinthitis: assessment of molecular size of autoantigens in fractions of inner ear proteins eluted on the Mini Whole Gel Eluter. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 2002;122:692-7.
 17. Gloddek B, Arnold W. Clinical and experimental studies of autoimmune inner ear disease. *Acta Otolaryngol Suppl* (Stockh) 2002(suppl 548):10-4.
 18. Suzuki M, Harris JP. Expression of intercellular adhesion molecule-1 during inner ear inflammation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:69-75.
 19. Stearns GS, Keithley EM, Harris JP. Development of high endothelial venule-like characteristics in the spiral modiolar vein induced by viral labyrinthitis. *Laryngoscope* 1993;103:890-8.
 20. Harris JP, Fukuda S, Keithley EM. Spiral modiolar vein: its importance in inner ear inflammation. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 1990;110:357-65.
 21. Fukuda S, Harris JP, Keithley EM, Ishikawa K, Kuçuk B, Inuyama Y. Spiral modiolar vein: its importance in viral load of the inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1992;101(suppl 157):67-71.
 22. Ma C-L, Billings P, Harris JP, Keithley EM. Characterization of an experimentally induced inner ear immune response. *Laryngoscope* 2000;110:451-6.
 23. Kornblut AD. Foreword. Symposium on Granulomatous Disorders of the Head and Neck. *Otolaryngol Clin North Am* 1982;15:471-520.
 24. Ichimiya I, Kurono Y, Hirano T, Mogi G. Changes in immunostaining of inner ears after antigen challenge into the scala tympani. *Laryngoscope* 1998;108:585-91.
 25. Chen MC, Harris JP, Keithley EM. Immunohistochemical analysis of proliferating cells in a sterile labyrinthitis animal model. *Laryngoscope* 1998;108:651-6.
 26. Iwai H, Tomoda K, Sugiura K, Inaba M, Ikehara S, Yamashita T. T cells infiltrating from the systemic circulation proliferate in the endolymphatic sac. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:1146-50.
 27. Takahashi M, Harris JP. Analysis of immunocompetent cells following inner ear immunostimulation. *Laryngoscope* 1988;98:1133-8.
 28. Shibata S, Yamane H, Konishi K, et al. Induction of macrophage exudation in the inner ear by OK432 treatment. *Acta Otolaryngol Suppl* (Stockh) 1998(suppl 538):26-31.
 29. Kaylie DM, Hefeneider SH, Kempton JB, et al. Decreased cochlear DNA receptor staining in MRL.MpJ-Fas(lpr) autoimmune mice with hearing loss. *Laryngoscope* 2001;111:1275-80.
 30. Shimazaki T, Ichimiya I, Suzuki M, Mogi G. Localization of glucocorticoid receptors in the murine inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:1133-8.
 31. Wobig RJ, Kempton J, Trune DR. Steroid-responsive cochlear dysfunction in the MRL/lpr autoimmune mouse. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;121:344-7.
 32. Ruckenstein MJ, Sarwar A, Hu L, Shami H, Marion TN. Effects of immunosuppression on the development of cochlear disease in the MRL-Fas(lpr) mouse. *Laryngoscope* 1999;109:626-30.
 33. Lunardi C, Bason C, Leandri M, et al. Autoantibodies to inner ear and endothelial antigens in Cogan's syndrome. *Lancet* 2002;360:915-21.
 34. Ramírez Camacho R, García Berrocal JR, Trinidad A, Martín Marero A, Buján J. Actividad citotóxica coclear del cisplatino en animales de experimentación. Un estudio con microscopía electrónica de barrido. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002;53:538-42.
 35. Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Buján J, Martín-Marero A, Trinidad A. Supporting cells as a target of cisplatin-induced inner ear damage: therapeutic implications. *Laryngoscope* (in press).

ANEXO VI

Adverse Effects of Glucocorticoid Therapy for Inner Ear Disorders

José Ramón García-Berrocal Rafael Ramírez-Camacho David Lobo
Almudena Trinidad José María Verdaguer

Service of Otorhinolaryngology, Hospital Puerta de Hierro, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Key Words

Glucocorticosteroids · Inner ear disorders · Sudden hearing loss · Immune-mediated inner ear disease

Abstract

Background: Because of their anti-inflammatory effects and suppression of the immune system, glucocorticoids have been widely used in otolaryngologic disorders and perioperative conditions. **Objective:** The objective of the present study was to determine the incidence of adverse effects after the administration of glucocorticosteroids in patients affected by diverse inner ear disorders. **Methods:** One hundred and sixty-three patients affected by sudden sensorineural hearing loss, 39 with progressive sensorineural hearing loss and 16 with fluctuating sensorineural hearing loss were subjected to glucocorticosteroid therapy with 6-methylprednisolone at a starting dose of 1 mg/kg body weight per day; this therapy was tapered during the next 21–28 days. In 20 patients with profound hearing loss (>70 dB), 3 boluses of prednisolone-21-hydrogen-succinate (500 mg per day) were administered. After receiving the boluses, these patients continued with the oral 6-methylprednisolone scheme. **Results:** Mild adverse effects were observed in 16 patients (7.01%). Only 2 patients (0.9%) with sudden sensorineural hearing loss showed severe complications: peptic ulcer and avascular necrosis of the femoral heads. **Conclu-**

sions: The low percentage of severe adverse effects observed in the present study validates the use of corticosteroids for the treatment of inner ear disorders although we should not underestimate these rare complications.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Introduction

Glucocorticoids, derived from cholesterol, are produced by the adrenal cortex and their secretion are controlled by the pituitary adrenocorticotrophic hormone in a negative feedback system. The use of corticosteroids for a few weeks does not lead to suppression of the hypothalamic-pituitary axis. When long-term therapy is required, a short-acting corticosteroid, such as prednisolone, will help limit side effects. Complications associated with the long-term use of corticosteroids are not infrequent. Peptic ulcers and osteonecrosis are dramatic adverse effects usually associated with long-term therapy. Because of their anti-inflammatory effect and suppression of the immune system, glucocorticoids have been widely used in otolaryngologic disorders and perioperative conditions [1]. Although scientific evidence is lacking, short-term treatment with high doses of methylprednisolone is used in immune disorders of the inner ear, sudden sensorineural hearing loss (SNHL) and Ménière's disease [2, 3].

Even though there is general agreement that corticosteroids are elective in the treatment of many diseases, advantages should overcome the potential side effects. Treatment with corticosteroids is a risk factor for Cushing habitus, acne, hirsutism, fluid imbalance, hyperglycemia, hypertension, osteoporosis, peptic ulcer and avascular necrosis of the femoral heads.

The present study reports the incidence of adverse effects in a group of patients affected by diverse inner ear disorders treated with glucocorticosteroids. To the best of our knowledge, two dramatic complications, bleeding from peptic ulcer and osteonecrosis of the femoral heads, are reported for the first time for these inner ear conditions.

Patients and Methods

A retrospective case series study was performed to determine the incidence of adverse effects after the administration of glucocorticosteroids in 218 patients who presented with sudden SNHL, progressive SNHL, or fluctuating SNHL punctuated by episodes of vertigo, tinnitus and aural fullness (assisted between January 1993 and June 2004). The clinical evaluation included a routine history and physical examination, pure-tone audiogram and immunologic workup study. The immunologic workup study included: erythrocyte sedimentation rate, antinuclear autoantibodies, serum immunoglobulins IgG, IgA and IgM, complement factors C3 and C4, heat shock protein 70 (OTOblot™, OTOimmune Diagnostics, IMMCO Diagnostics, Buffalo, N.Y., USA) and phenotype of peripheral blood lymphocytes (by 3-color flow cytometry) in which patients were compared with 14 healthy control subjects (9 men and 5 women; mean age 36 years).

Informed consent was obtained from all patients before withdrawal of the blood samples. The tests were carried out prior to the start of steroid therapy with 6-methylprednisolone. An MRI study was performed to rule out abnormalities of the eighth nerve.

Sudden SNHL

One hundred and sixty-three patients (97 men and 66 women; mean age 40.9 years; age range 12–80 years) with sudden SNHL were included in the present study according to the following criteria: (1) stable, unilateral SNHL that occurred in less than 72 h; (2) an interval of less than 14 days since the onset of hearing loss; (3) absence of retrocochlear disease; (4) average hearing levels from 250 to 4,000 Hz at less than 30 dB in the affected ear; (5) average hearing in the affected ear at the initial examination of more than 30 dB, and (6) follow-up of more than 1 year [4].

Patients were hospitalized for 3–6 days and treated with 6-methylprednisolone at a starting dose of 1 mg/kg body weight per day; this therapy was tapered during the next 21–28 days (64 mg/day for 4 days; 48 mg/day for 4 days; 32 mg/day for 4 days; 16 mg/day for 3 days; 8 mg/day for 3 days; 4 mg/day for 3 days). In 20 patients with profound hearing loss (>70 dB), 3 boluses of prednisolone-21-hydrogen-succinate (500 mg per day) were adminis-

tered. After receiving the boluses, these patients continued with the oral 6-methylprednisolone scheme. Steroid perfusion of 6-methylprednisolone to the round window was performed after failure of conventional therapy in 5 patients. Complementary therapy included 100% O₂ inhalation, low-molecular-weight heparin (0.4 ml s.c./day) and nimodipine (30 ml i.v./8 h) during the hospitalization (3–5 days). Outpatients received oral nimodipine (30 mg/day for 1 month) and oral 6-methylprednisolone scheme [5–7].

Progressive SNHL

The diagnosis of progressive SNHL was based on criteria reported by Moscicki et al. [8]. Thirty-nine patients (16 men and 23 women; mean age 42.2 years; age range 15–69 years) were included.

Fluctuating SNHL

Twenty-six patients with fluctuating SNHL (12 men and 14 women; mean age 40.4 years; age range 8–71 years) with the diagnosis of Ménière's disease as defined by the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery [9] were studied.

Patients affected by progressive SNHL and fluctuating SNHL were subjected to oral administration of 6-methylprednisolone at a starting dose of 1 mg/kg body weight per day; this therapy was tapered during the next 21 days. Sera were only stored for a variable period to perform the Western blot immunoassay and the immunophenotype by 3-color flow cytometry in order to increase the cost-effectiveness.

Steroid perfusion of 6-methylprednisolone (0.5–1 ml of the standard methylprednisolone solution, 40 mg/ml) to the round window was weekly performed for 2 months after failure of conventional therapy in 14 patients (5 with sudden SNHL, 4 with progressive SNHL and 4 with fluctuating SNHL).

Results

Mild adverse effects were observed in 10 patients treated with systemic glucocorticosteroids and 6 subjected to local therapy. Only 2 patients showed severe complications after systemic administration of 6-methylprednisolone: peptic ulcer and avascular necrosis of the femoral heads (table 1). The percentage of adverse effects was 7.8% (18/228). Only 0.9% of patients showed a severe complication (2/218); however, if we only consider the pulse dose therapy, the percentage of severe adverse effects rises to 5% (1/20 patients). A 65-year-old woman affected by sudden SNHL that presented with peptic ulcer was assisted by hematemesis. She was subjected to emergency surgical exploration to control hemorrhage. A 28-year-old woman with a profound sudden hearing loss presented with a bilateral necrosis of the femoral heads. The diagnosis was obtained 12 months after therapy. She was administered prednisolone-21-hydrogen-succinate (3 boluses of 500 mg) and after that she continued the oral therapy previ-

Table 1. Adverse effects after glucocorticosteroid therapy observed in patients from the present study

	Sudden SNHL	Progressive SNHL	Fluctuating SNHL
Cushing features			4
Muscle weakness		1	
Hyperglycemia		1	2
Reduction in libido		1	
Insomnia			1
Peptic ulcer	1 (oral scheme)		
Avascular necrosis of femoral heads	1 (pulse dose therapy)		
Vertigo	1		
Otorrhea			1
Perforation of the tympanic membrane	2	1	1

ously reported (6-methylprednisolone 1 mg/kg body weight per day; this therapy was tapered during the next 21 days; total dose 2,280 mg). Both patients showed a partial recovery of hearing. At present, the patient with osteonecrosis is being treated with osseous growth factors.

Discussion

Corticosteroids are widely used in the treatment of several inner ear disorders; although the specific action of steroids is not completely known, they may be beneficial in infectious, inflammatory and immune-mediated conditions.

Glucocorticosteroids are the mainstay of treatment in patients affected by immune disorders of the inner ear [10]. Corticosteroids exert a potent suppression of the immune-mediated inflammatory response by inhibition of the interleukin-1 system.

The existence of a great number of glucocorticoid receptors in the stria vascularis, spiral ligament and the supporting cells of the organ of Corti suggest their role as immune targets of the inner ear and justify the corticosteroid therapy. Transtympanic application could induce permeation of the drugs through the round window membrane into the inner ear fluids. Steroids may also cause vasodilatation with increased microvascular blood flow in the cochlea. This might be due to the antioxidant effects of glucocorticoids.

Since immune-mediated hearing loss is one of the few forms of SNHL that may respond to treatment, a high-

dose therapy is continued for 1 month. Glucocorticosteroids then are tapered over several weeks. A low dose is recommended daily for several months; a high-dose repeat treatment should be considered if hearing falls again when tapering. A prospective, randomized clinical trial to validate this empirical approach has recently been concluded [11].

Sudden SNHL has been defined as the loss of at least 30 dB of hearing in at least 3 contiguous frequencies in fewer than 3 days in an otherwise healthy person [12]. One study on the efficacy of steroids in the treatment of idiopathic sudden SNHL met the methodologic rigor of a double-blind, randomized control trial [13]. However, no consensus exists on the effective treatment of idiopathic sudden SNHL, showing poor correlation between dosage and recovery [14]. General guidelines based on scientific data are not available. Likewise, a spontaneous remission has been reported [15]. Glucocorticoids seem to exhibit their effect during SNHL not only on hair cells but on cochlear vessels which are disturbed by a virus-induced and/or immunologically induced vasculitis [16].

Alexiou et al. [17] did not report severe side effects in a group of 302 patients affected by sudden SNHL that received a daily dose of 500–1,000 mg of prednisolone-21-hydrogen-succinate during the first 3 days, and continued with an oral scheme beginning with 100 mg of prednisolone for 16 days, with a decreasing dosage.

Although the pathology of Ménière's disease is well established as endolymphatic hydrops, the treatment is still empirical in spite of all the recent advances. It has been suggested that a subgroup of patients with symptoms of Ménière's disease may share a common pathophysiology with autoimmune inner ear disease. The anti-inflammatory and immunosuppressive action of steroids results in improvement of symptoms. In order to decrease the side effects of systemic steroid application, transtympanic administration through a ventilation tube or by means of delivering devices have been used [18, 19].

Contraindications to glucocorticoids include pregnancy, hypersensitivity, peptic ulcer disease, active tuberculosis, psychosis, glaucoma, hypertension, recent vaccination, uremia, severe diabetes and others. Side effects are common with high-dose glucocorticosteroids, although Harris et al. [11] showed no significant adverse events in autoimmune inner ear disease patients with 18 weeks of high-dose oral steroid regimen.

Although in the USA it is uncommon to give corticosteroids intravenously, according to the principles of high-dose (pulse dose) corticoid therapy used by other

specialties (neurology, transplantation medicine), we applied similar doses for profound hearing loss with sudden onset (dead ear) since this entity represents an acute and dramatic experience for the patient that might strongly limit the quality of life.

Based on our findings, only a few patients experienced adverse effects during therapy with glucocorticoids (7.8%). Only 2 (0.9%) patients showed a severe complication. Avascular necrosis of the femoral heads is a rare complication mainly occurring with long-term therapy. To the best of our knowledge, the case of avascular necrosis of the femoral heads presented in a patient with sudden SNHL due to short-term, high-dose steroid therapy has not previously been described. Our patient did not present facilitating factors. However, she showed a positive rheumatoid factor suggesting the diagnosis of rheumatoid arthritis. This condition may have had an influence on the genesis of osteonecrosis, possibly facilitating the glucocorticosteroid side effect. Osteonecrosis devel-

ops as the end result of reduced blood flow to the femoral head. However, therapy for sudden SNHL includes drugs that facilitate blood flow (nimodipine) and others that prevent coagulation alterations (low-molecular-weight heparin). This pharmacological treatment could theoretically have reduced the side effect of glucocorticosteroids observed in our patient.

There is suspicion that short-term, high-dose steroid use poses similar risks as long-term therapy. However, the low percentage of severe adverse effects observed in the present study validates the use of corticosteroids for the treatment of inner ear disorders although we should not underestimate these rare complications. In patients who cannot be subjected to corticosteroid therapy due to complications, a cochlear implant must be considered. Research is still required to develop novel treatment strategies that will minimize the current significant risks of treatment.

References

- Lee KJ: Pharmacology and therapeutics; in Lee KJ (ed): *Essential Otolaryngology Head and Neck Surgery*. Stamford, Appleton & Lange, 1999, pp 1067–1096.
- García Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Lobo D: Glucocorticoids: the best therapy for immune-mediated inner ear disease. *Curr Top Steroid Res* 2004;4:99–104.
- García Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Vargas JA, Millán I: Does the serological testing really play a role in the diagnosis of immune-mediated sensorineural hearing loss? *Acta Otolaryngol* 2002;122:243–248.
- García-Berrocal JR, Vargas JA, Ramírez-Camacho R, et al: Deficiency of naive T cells in patients with sudden deafness. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:712–717.
- Berrocal JR, Ramírez-Camacho R: Sudden sensorineural hearing loss: supporting the immunologic theory. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:989–997.
- García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Millán I, et al: Sudden presentation of immune-mediated inner ear disease: characterization and acceptance of a cochleovestibular dysfunction. *J Laryngol Otol* 2003; 117:775–779.
- Arellano B, García Berrocal JR, Górriz C, González FM, Vicente J, Ramírez Camacho R: Protocolo de tratamiento de la sordera súbita. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1997;48: 513–516.
- Moscicki RA, San Martin JE, Quintero CH, Rauch SD, Nadol JB, Bloch KJ: Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss. *JAMA* 1994;272: 611–616.
- Committee on Hearing and Equilibrium: Committee on hearing and equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Ménière's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:181–185.
- Hughes GB, Barna BP, Calabrese LH, Koo A: Immunologic disorders of the inner ear; in Bailey BJ (ed): *Head and Neck Surgery – Otolaryngology*. Philadelphia, Lippincott, 1993, pp 1833–1842.
- Harris JP, Weisman MH, Derebery JM, Espeland MA, et al: Treatment of corticosteroid-responsive autoimmune inner ear disease with methotrexate: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290:1875–1883.
- Wilson WR, Veltri RW, Laird N, Sprinkle PM: Viral and epidemiologic studies of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1983;91:653–658.
- Wilson WR, Byl FM, Laird N: The efficacy of steroids in the treatment of idiopathic sudden hearing loss. *Arch Otolaryngol* 1980; 106:772–776.
- Haberkamp TJ, Tanyeri HM: Management of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Am J Otol* 1999;20:587–595.
- Weinaug P: Die Spontanremission beim Hörsturz. *HNO* 1984;32:346–351.
- Gloddek B, Lamm K, Arnold W: Pharmacological influence on inner ear endothelial cells in relation to the pathogenesis of sensorineural hearing loss. *Adv Otorhinolaryngol* 2002;59:75–83.
- Alexiou C, Arnold W, Fauser C, Schratzenstaller B, Gloddek B, Fuhrmann S, et al: Sudden sensorineural hearing loss. Does application of glucocorticoids make sense? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:253–258.
- Arriaga M, Goldman S: Hearing results of intratympanic steroid treatment of endolymphatic hydrops. *Laryngoscope* 1998;108: 1682–1685.
- Silverstein H: Use of a new device, the Micro-Wick, to deliver medication to the inner ear. *Ear Nose Throat J* 1999;78:595–600.

ÍNDICE ANTROPONÍMICO

Asarch, Richard, 108

Beickert, Paul, 11, 109

Brookes, Gerald B., 20

Cadoni, Gabriella, 20

Carswell, Elizabeth A., 35

Carvalho, Gerard J., 111

Cohen, Stanley, 94, 95, 96, 98, 100, 101, 127, 128, 129

Cotter, Cheryl S., 20

Disher, Michael J., 20

García Berrocal, José Ramón, 6, 15, 20, 21, 107

García Callejo, Francisco Javier, 20

Gloddek, Bertrand, 116

Haake, Scott M., 121

Harris, Jeffrey P., 11, 18, 107

Helfgott, Simon M., 20

Hirose, Keiko, 20

Hughes, Gordon B., 16, 17

Kang, Stephen Y., 112

Kikuchi, Mitsuo, 3

Lefebvre, Philippe P., 97

Lehnhardt, Ernst, 3, 112

Lin, David W., 107

Liu, Yi-Chun, 96, 98, 100, 101, 128, 129

Lorenz, Robert R., 20

Loveman, Donald M., 20

Lunardi, Claudio, 20

Ma, Chung-lei, 110

Matteson, Eric L., 94, 96, 98, 99, 100, 101, 127

Mazlumzadeh, Mehrdad, 20

McCabe, Brian F., 3, 4, 16, 17

Morovic Vergles, Jadranka, 97, 98, 100, 101, 128

Moscicki, Richard A., 20

Nariuchi, Hideo, 107

Nair, Thankam S., 107

Rahman, Mahboob U., 94, 96, 98, 99, 100, 101, 127

Rauch, Steven D., 20

Ross, Uwe H., 116

Ruckenstein, Michael J., 107

Sasaki, Yukihiro, 11, 109

Scherer, Elias Q., 95, 96, 98, 100, 101, 128, 129

Sehitoglu, Mehmet A., 108

Solares, Arturo C., 107

Soliman, Ahmed M., 107

Staecker, Hinrich, 96, 97, 98, 100, 101

Street, Ian, 95, 96, 98, 100, 101

Terayama, Yoshihiko, 11, 109

Van Wijk, France, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 128

Veldman, Jan E., 20

Wang, Xiaobo, 110, 111, 122

Woolf, Nigel K., 107

Yamanobe, Shigeharu, 107

Yang, Grace S., 110

Zavod, Matthew B., 20

Zeitun, Hisham, 20